

1 LAP20 Rec'd PCT/JP 10 APR 2006

## 明 細 書

## 無血清馴化したゲノム改変細胞

## 5 技術分野

本発明は、血清を含有しない培地（以下、「無血清培地」と称す）に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に關与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞および該細胞を用いた抗体組成物を始めとする糖蛋白質組成物の製造方法に關する。

10

## 背景技術

花井らは、抗体のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加が抗体の抗体依存性細胞傷害活性（ADCC 活性）を50倍以上低下させると言った大きい影響を与えることを報告している [W000/61739、J. Biol. Chem., 278, 3466, (2003)]。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造が変わることでエフェクター機能と關連した薬理活性が変化することを示している。

15

一般的に、医薬への応用が考えられている抗体を始めとする糖蛋白質の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞などを宿主細胞として用い製造されている。しかしながら、発現させた糖蛋白質の糖鎖構造は宿主細胞によって異なるため、現状では、必ずしも、最適な薬理活性が発揮できるような糖鎖が付加されているとは限らない。

20

特に、抗体のように、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加が大きく薬理活性を下げるというような場合には、フコース修飾のない糖鎖構造を有する抗体分子を適切に調製し提供することが質の高い医療を患者へ提供する上で欠かせない。したがって、このような糖蛋白質の糖鎖構造を制御する技術の開発が望まれている。

25

糖蛋白質の糖鎖構造は、糖鎖遺伝子、すなわち、糖鎖を合成する糖転移酵素と糖鎖を分解する糖分解酵素の遺伝子によって規定されている。また、糖鎖への糖の供与体となる細胞内糖ヌクレオチドの生合成やゴルジ体への輸送などの機能を担った蛋白質の遺伝子によっても規定されている。これまでに、これらの糖鎖の修飾に係わる遺伝子を導入したり変異を与えたりすることで、その宿主細胞が産生する糖蛋白質の糖鎖構造を制御できる可能性が示されている。

30

糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子を導入することによって、生産される糖蛋白質の糖鎖構造を改変する試みがなされているが、その具体的な例としては、1) ラットの $\beta$ -ガラクトシド $\alpha$ 2,6-シアリルトランスフェラーゼをCHO細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加された蛋白質の製造が可能であること [J. Biol. Chem., 261, 13848, (1989)]、2) ヒトの $\beta$ -ガラクトシド2- $\alpha$ フコシルトランスフェラーゼをマウスL細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース（以下、Fucとも表記する）が付加されたH抗原（Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-）の発現が可能であること [Science, 252, 1668, (1991)]、3)  $\beta$ 1,4-N-アセチルグルコサミ

35

ン転移酵素 III (GnTIII) を導入した CHO 細胞を用いて抗体を生産することで N-グリコシド結合糖鎖のパイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミンの付加の割合が高い抗体の生産が可能であること [Glycobiology, 5, 813 (1995)、W099/54342] を報告した例があげられる。GnTIII を導入した CHO 細胞を用いて抗体を発現させた場合には、親株で発現させた抗体と比べて 1.6 倍高い ADCC 活性を示したが、GnTIII あるいは  $\beta$ 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV) の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すと報告されている。

糖鎖の修飾に係わる遺伝子の活性が変化した突然変異体は、例えば、WGA (*T. vulgaris* 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (*C. ensiformis* 由来の concanavalin A)、RIC (*R. communis* 由来の毒素)、L-PHA (*P. vulgaris* 由来の leucoagglutinin)、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin)、PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin) などのレクチンに耐性を示す株として取得されている [Somatic cell Mol. Genet., 12, 51, (1986)]。このような糖鎖の修飾に係わる遺伝子の活性が変化した突然変異体を宿主細胞として用いることで、生産される糖鎖構造が変化した糖蛋白質の生産例も報告されており、その具体的な例としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI) の活性が欠損している CHO 細胞変異株を用いてハイマンノース型糖鎖構造を有する抗体を生産した報告を挙げることができる [J. Immunol., 160, 3393, (1998)]。

また、CMP-シアル酸トランスポーターや UDP-ガラクトーストランスポーターの欠損株を用いて、糖鎖非還元末端側にシアル酸が付加していない糖鎖構造を有する抗体の発現や、ガラクトースの付加のない抗体の発現例が報告されているが、医薬への応用に適するようにエフェクター作用を向上させた抗体の発現には成功していない [J. Immunol., 160, 3393, (1998)]。

このような中、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの de novo 合成経路において、GDP-マンノースを GDP-4-ケト,6-デオキシ-GDP-マンノースに変換する脱水反応を触媒する酵素である GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼの活性が低下した株を宿主細胞として用いることで、ADCC 活性の高い医薬応用に適した抗体の生産に成功した報告がなされている [W000/61739, J. Biol. Chem., 277, 26733, (2002)]。これらの報告では、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を示す株、例えば、AAL (*Aleuria aurantia* 由来の Lectin) に耐性を示す CHO-AAL 株、LCA (*L. culinaris* 由来の lentil agglutinin) に耐性を示す CHO-LCA 株あるいは Lec13 株が宿主細胞として用いられている。また、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼの活性が低下した株としては、この他にも、マウス白血病由来の細胞株 BW5147 の PSA (*P. sativum* 由来の Pea lectin) 耐性変異株として樹立された PL<sup>R</sup>1.3 が知られている [J. Biol. Chem., 255, 9900, (1980)]。

しかしながら、これらいずれの株も完全な遺伝子欠損体ではないため、抗体が高い ADCC 活性を示す原因となっている糖鎖構造、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加をより完全に抑制することは困難である。特に、PL<sup>R</sup>1.3 や Lec13 株などの変異株は、変異剤処理によりランダムに変異を導入することで取得されており、医薬品製造に用いる株として必ずしも適した性質を有しているとは言い難い。一方、宿主細胞の糖鎖修飾に係わる酵素遺伝子を標的とし意図的に標的遺伝子のみを破壊した細胞株を用いて抗体などの糖蛋白質の生産を試みた報告はこれまでにない。

また、動物細胞や組換え動物細胞による糖蛋白質などの生理活性蛋白質の生産において、培養液中に血清が存在すると、血清のロット差が細胞収率や生産性に大きな影響を与える上、ウイルスやプリオン等の病原微生物の最終精製品への混在の可能性を考慮する必要がある。従って、動物細胞を用いて医薬品への適応を目的とした生理活性蛋白質の生産を行う場合、血清を含有しない培地で培養することが望まれている。

#### 発明の開示

無血清培地に馴化した N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与するゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞、該細胞を用いた糖蛋白質組成物の製造方法、該製造方法で製造された糖蛋白質組成物を提供することを目的とする。本発明の細胞は、糖鎖構造の改変された医薬開発上有用な抗体組成物等の糖蛋白質組成物の製造に有用である。

本発明は、以下の (1)～(27) に関する。

(1) 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞。

(2) 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた、上記 (1) に記載の細胞。

(3) 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子の開始コドンを含むエクソン領域の部分が欠失した、上記 (1) または (2) に記載の細胞。

(4) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、上記 (1)～(3) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(5)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(6)  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、上記 (4) に記載の細胞。

(a) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

(7) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、上記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(8) 耐性が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンを含む培地で培養した場合に、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞よりも高い生存率を示すことを特徴とする耐性である、上記 (7) に記載の細胞。

(9) 無血清培地が無蛋白培地である、上記 (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(10) 糖蛋白質をコードする遺伝子を含む上記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の細胞。

(11) 糖蛋白質が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を有さない糖蛋白質である上記 (10) に記載の細胞。

(12) 糖蛋白質が、抗体である上記 (10) または (11) に記載の細胞。

(13) 抗体のクラスが IgG である、上記 (12) に記載の細胞。

(14) 上記 (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、糖蛋白質組成物を製造する方法。

(15) 上記 (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に糖蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から糖蛋白質組成物を採取し、精製する工程を含む、糖蛋白質組成物を製造する方法。

(16) 糖蛋白質組成物を製造する方法が、バッチ培養、フェドバッチ培養またはパーフュージョン培養である、上記 (14) または (15) に記載の方法。

(17) 培養中に、栄養因子および生理活性物質から選ばれる少なくとも一種を培地に添加する、上記 (14) ~ (16) のいずれか 1 項に記載の方法。

(18) 栄養因子がグルコース、アミノ酸およびビタミンから選ばれる少なくとも一種である、上記 (17) に記載の方法。

(19) 生理活性物質が、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリンおよびアルブミンから選ばれる少なくとも一種である、上記 (17) に記載の方法。

(20) 糖蛋白質組成物が、抗体組成物である上記 (14) ~ (19) のいずれか 1 項に記載の方法。

(21) 細胞密度を  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞/ml となるように馴化培地へ接種することとを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞の無血清培地への馴化方法。

(22) 上記 (21) に記載の方法で細胞を無血清培地に馴化させた後、クローン化することとを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフ



コースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞株を取得する方法。

(23) 上記(21)に記載の方法で得られる、無血清培地に馴化したN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾  
5 に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞。

(24) 上記(22)に記載の方法で得られる、無血清培地に馴化したN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾  
に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされたクローン細胞株。

(25) 無血清培地が無蛋白培地である、上記(21)または(22)に記載の方法。

10 (26) 無血清培地が無蛋白培地である、上記(23)に記載の細胞。

(27) 無血清培地が無蛋白培地である、上記(24)に記載のクローン細胞株。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003年10月9日に出願された日本国特許出願  
2003-350166号の優先権を主張するものであり、当該特許出願の明細書および図面に記載され  
15 る内容を包含する。

本発明の、無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグル  
コサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノッ  
クアウトされた細胞（以下、「本発明の細胞」と表記する）とは、N-グリコシド結合複合型糖  
20 鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与  
する酵素（以下、「 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素」と表記する）の活性が消失するようにゲノム遺  
伝子が改変された細胞があげられる。

ここで、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性を消失するようにゲノムが改変されたとは、該酵素  
の発現を消失させるように該遺伝子の発現調節領域に変異を導入したり、あるいは該酵素の機  
25 能を消失させるように該遺伝子のアミノ酸配列に変異を導入することをいう。変異を導入する  
とは、ゲノム上の塩基配列に欠失、置換、挿入および／または付加といった塩基配列の改変を  
行うことをいう。このように改変されたゲノム遺伝子の発現または機能を完全に抑制するこ  
とをノックアウトするという。ゲノム遺伝子をノックアウトする具体的な例としては、標的とな  
る遺伝子のすべてまたは一部がゲノムから削除された例があげられる。具体的には、 $\alpha$ -1,6-  
30 フコース修飾酵素をコードする遺伝子において、少なくとも開始コドンを含むエクソンのゲノ  
ム領域を染色体上から欠失させること、またはすべての対立遺伝子を欠失させることなどがあ  
げられる。

したがって、本発明の細胞としては、無血清培地に馴化した、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の、  
ゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞、該酵素の少なくとも開始コドン  
35 を含むエクソン領域の部分が欠失した細胞などがあげられる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコ  
サミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をいう。N-グリコシド結

合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、該反応に影響を与える酵素も包含される。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

- 5      また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に影響を与える酵素としては、上述の  $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

本発明において、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)あるいは(h)の DNA がコードする蛋白質、または下記(i)、(j)、(k)、(l)、(m)、(n)、(o)、(p)、(q)、(r)、(s)あるいは(t)の蛋白質などがあげられる。

- 10      (a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA  
         (b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA  
         (c) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA  
         (d) 配列番号 4 で表される塩基配列からなる DNA  
15      (e) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA  
         (f) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA  
         (g) 配列番号 3 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA  
20      (h) 配列番号 4 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA  
         (i) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
         (j) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
25      (k) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
         (l) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質  
         (m) 配列番号 5 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質  
30      (n) 配列番号 6 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質  
         (o) 配列番号 7 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質  
35      (p) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(q) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(r) 配列番号6で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

5 (s) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(t) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

10 また、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1、2、3または4で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1、2、3または4で表される塩基配列を有するDNAとストリンジентな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、2、3または4で表される塩基配列を有するDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-1997)（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・

15

20

25

30

バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、2、3または4で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

本発明において、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる

35

蛋白質をいう。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

5      また、本発明において、配列番号5、6、7または8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質とは、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号5、6、7または8に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、  
10      さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上である蛋白質であることをいう。

本発明の細胞を取得する方法としては、目的とするゲノムの改変を行うことができれば、いずれの手法でも用いることができるが、遺伝子工学的な手法が望ましい。その具体的な手法としては、

15      (a)  $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

(b)  $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素についての突然変異を導入する手法などがあげられる。

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性な細胞株を選択する方法を用いることにより、本発明の細胞を選択することができる。

20      レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞をいう。有効濃度とは、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞（以下、親株細胞とも称す）が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞が生育できない濃度と同濃度、より好ましくは2～5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

25      本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常10 $\mu$ g/ml～10mg/ml、好ましくは0.5mg/ml～2.0mg/mlである。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (*Lens Culinaris* 由来の *Lentil Agglutinin*) エンドウマメレクチンPSA (*Pisum sativum* 由来の *Pea Lectin*)、ソラマメレクチンVFA (*Vicia faba* 由来の *Agglutinin*)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (*Aleuria aurantia* 由来の *Lectin*) などがあげられる。

本発明の細胞としては、糖蛋白質を発現できる細胞であればいかなる細胞でもよいが、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられ、これらの細胞の具体的な例としては、後述の  
35      2. に記載のものがあげられる。動物細胞の具体例としては、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマル

バ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などがあげられる。好ましくは、抗体などの糖蛋白質の製造に用いられる、上述のミエローマ細胞、ハイブリドーマ細胞、ヒト化抗体あるいはヒト抗体を製造するための宿主細胞、ヒト抗体を生産するヒト以外のトランスジェニック動物を製造するために用いる胚性幹細胞または受精卵細胞、ならびにヒト化抗体およびヒト抗体を生産するトランスジェニック植物を製造するために用いる植物細胞などがあげられる。

ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞（以下、親株細胞とも称す）は、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子をノックアウトさせるための手法を施す前の細胞をいう。ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞としては、特に限定はないが、例えば、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の NS0 細胞としては、バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.), 73, 261, (2001) 等の文献に記載されている NS0 細胞があげられる。また、理化学研究所細胞開発銀行に登録されている NS0 細胞株 (RCB0213)、あるいはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株などもあげられる。

ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の SP2/0-Ag14 細胞としては、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 126, 317, (1981)、ネイチャー (Nature), 276, 269, (1978)、ヒューマン・アンチボディーズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antibodies and Hybridomas), 3, 129, (1992) 等の文献に記載されている SP2/0-Ag14 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL-1581) あるいはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株 (ATCC CRL-1581.1) などもあげられる。

ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前のチャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p883-900) 等の文献に記載されている CHO 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている CHO-K1 株 (ATCC CCL-61)、DUXB11 株 (ATCC CRL-9096)、Pro-5 株 (ATCC CRL-1781) や、市販の CHO-S 株 (Lifetechnologies 社製 Cat#11619)、あるいはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株などもあげられる。

ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前のラットミエローマ細胞株

YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞としては、Y3/Ag1.2.3 細胞 (ATCC CRL-1631) から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、J. Cell. Biol., 93, 576 (1982)、Methods Enzymol. 73B, 1 (1981) 等の文献に記載されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL-1662) あるいはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株などもあげられる。

本発明の細胞は、抗体などの糖蛋白質に付加される糖鎖構造のうち、フコースの修飾に関する酵素が欠失する。したがって、本発明の細胞に糖蛋白質をコードする遺伝子を含めた細胞では、生産された糖蛋白質がフコース修飾を受けず、その結果、高い生理活性を有する糖蛋白質組成物を無血清培養で安定に製造することができる。

高い生理活性を有する糖蛋白質組成物とは、受容体との親和性が向上する糖蛋白質組成物、血中の半減期が向上する糖蛋白質組成物、血中投与後の組織分布が変化する糖蛋白質組成物、薬理活性発現に必要な蛋白質との相互作用が向上する糖蛋白質組成物などをいう。

したがって、本発明の糖蛋白質組成物としては、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の親株細胞で生産した場合、その産生蛋白質の糖鎖構造にフコースの修飾がある糖蛋白質であればいかなる糖蛋白質組成物も含有される。その具体的な例としては、抗体、エリスロポイエチン、トロンボポイエチン、組織型プラスミノージェンアクチベータ、プロウロキナーゼ、トロンボモジュリン、アンチトロンビン III、プロテイン C、血液凝固因子 VII、血液凝固因子 VIII、血液凝固因子 IX、血液凝固因子 X、血液凝固因子 XII、性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、ケラチノサイト増殖因子、アクチビン、骨形成因子、幹細胞因子 (SCF)、インターフェロン  $\alpha$ 、インターフェロン  $\beta$ 、インターフェロン  $\gamma$ 、インターロイキン 2、インターロイキン 6、インターロイキン 10、インターロイキン 11、可溶性インターロイキン 4 受容体、腫瘍壊死因子  $\alpha$ 、DnaseI、ガラクトシダーゼ、 $\alpha$  グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼなどがあげられる。

フコース修飾のない糖鎖構造を有することで、その生理活性が大幅に上昇する糖蛋白質のより具体的な例としては、例えば、抗体組成物があげられる。

したがって、本発明の細胞は、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞が生産する抗体組成物より、高い ADCC 活性を有する抗体組成物を生産することができる。

また、本発明の細胞は、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞よりも高い抗体組成物を生産することができる。

抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物をいう。

抗体は、重鎖、軽鎖の 2 種類のポリペプチド鎖がそれぞれ 2 分子ずつ会合した 4 量体である。重鎖の N 末端側の約 4 分の 1 と軽鎖の N 末端側の約 2 分の 1 (それぞれ 100 余アミノ酸) は可変領域と呼ばれ、多様性に富み、抗原との結合に直接関与する。可変領域以外の部分の大半は定常領域と呼ばれる。抗体分子は定常領域の相同性により IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の各クラスに分類される。

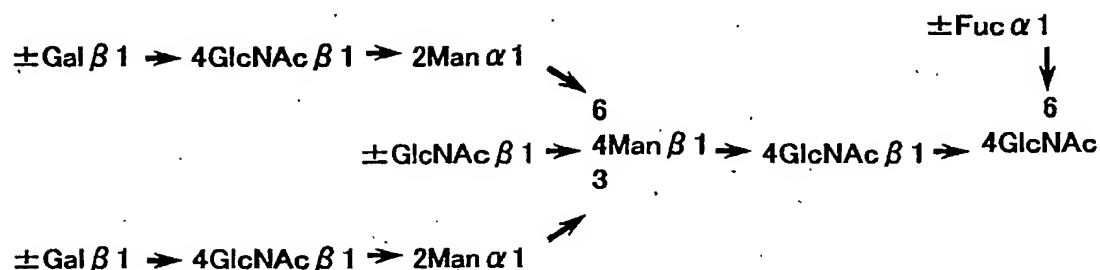
また IgG クラスは定常領域の相同性により、さらに IgG1~IgG4 のサブクラスに分類される。

重鎖は N 末端側より VH、CH1、CH2、CH3 の 4 つのイムノグロブリンドメインに分かれ、CH1 と CH2 の間にはヒンジ領域と呼ばれる可動性の高いペプチド領域があり、CH1 と CH2 とが区切られる。ヒンジ領域以降の CH2 と CH3 からなる構造単位は Fc 領域と呼ばれ、N-グリコシド結合糖鎖が結合している。また、この領域は、Fc レセプター、補体などが結合する領域である (免疫学イラストレイテッド原書第 5 版、2000 年 2 月 10 日発行、南江堂版、抗体工学入門、1994 年 1 月 25 日初版、地人書館)。

抗体などの糖蛋白質の糖鎖は、蛋白質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖 (N-グリコシド結合糖鎖) とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖 (O-グリコシル結合糖

鎖)の2種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、以下の化学式1に示す基本となる共通のコア構造を有する[生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター) 高橋禮子編(1989年)]。

化学式1



5.

化学式1において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

N-グリコシド結合糖鎖としては、化学式1で示されるのコア構造を有するものがあげられ、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン(以下、Gal-GlcNAcと表記する)の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型(複合型)、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあげられる。

抗体分子のFc領域には、N-グリコシド結合糖鎖が1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体分子に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、前記化学式1で示されるコア構造を含むいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。

したがって、本発明の細胞を用いて製造される抗体組成物は、本発明の効果が得られる範囲であれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。そのような本発明により得られる抗体組成物として、好ましくは、抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の親株細胞が生産する抗体組成物よりも高い抗体組成物があげられる。

25 抗体組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に



含まれる Fc 領域に結合する全ての N-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の数が占める割合をいう。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに  $\alpha$  結合していない糖鎖をいう。具体的には、フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖があげられる。

本発明の抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合としては、好ましくは 20% 以上、より好ましくは 30% 以上、さらに好ましくは 40% 以上、特に好ましくは 50% 以上、最も好ましくは 100% である抗体組成物があげられる。

ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞が生産する抗体組成物よりも ADCC 活性が高い抗体組成物としては、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞が生産する抗体組成物の該割合よりも高いものがあげられる。具体的には、該割合が 2 倍以上、好ましくは 3 倍以上、より好ましくは 5 倍以上、特に好ましくは 10 倍以上高い抗体組成物があげられ、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の全てが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が結合していない糖鎖である抗体組成物が最も好ましい。

上述の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 100% である抗体組成物、または抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の全てが、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が結合していない糖鎖である抗体組成物としては、後述の 6. に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の検出限界以下であることをいう。

本発明により得られる抗体組成物において、Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞が生産する抗体組成物よりも高い場合、本発明により得られる抗体組成物は、親株細胞が生産する抗体分子からなる抗体組成物より高い ADCC 活性を有する。

ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する Fc レセプターとの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性をいう [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルス・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等があげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法 [生物化学実験法 23—糖タンパク質糖鎖研究法

(学会出版センター) 高橋禮子編 (1989) ]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)]で分析することによっても決定することができる。また、本発明の抗体としては、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスは IgG が好ましい。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Anticancer Res., 13, 331, 1993)、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260, 1993)、抗 GM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511, 1994)、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285, 1992)、抗 CD52 抗体 (Nature, 332, 323, 1988)、抗 MAGE 抗体 (British J. Cancer, 83, 493, 2000)、抗 HM1.24 抗体 (Molecular Immunol., 36, 387, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909, 2000)、抗 FGF8 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF8 受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455, 1990)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647, 1995)、抗 PMSA 抗体 (J. Urology, 160, 2396, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138, 2000)、抗 CA125 抗体、抗 17-1A 抗体、抗インテグリン  $\alpha v \beta 3$  抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD22 抗体、抗 HLA 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD19 抗体、抗 EGF 受容体抗体 (Immunology Today, 21, 403, 2000)、抗 CD10 抗体 (American Journal of Clinical Pathology, 113, 374, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5, 1992)、抗インターロイキン 6 受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371, 1994)、抗インターロイキン 5 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5, 1992)、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体 (Cytokine, 3, 562, 1991)、抗インターロイキン 4 受容体抗体 (J. Immunol. Meth., 217, 41, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Hybridoma, 13, 183, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Molecular Pharmacol., 58, 237, 2000)、抗 CCR4 抗体 (Nature, 400, 776, 1999)、抗ケモカイン抗体 (J. Immunol. Meth., 174, 249, 1994)、抗ケモカイン受容体抗体 (J. Exp. Med., 186, 1373, 1997)、抗 IgE 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD11a 抗体 (Immunology Today, 21, 403, 2000)、抗 CCR2 抗体 (J. Immunol., 162, 1278, 1999)、抗 CCR8 抗体 (W099/25734)、抗 CCR3 抗体 (US6207155) などがあげられる。

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 GpIIb/IIIa 抗体 (J. Immunol., 152, 2968, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Science, 253, 1129, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (J. Biol. Chem., 272, 17400, 1997) または抗血液凝固因子抗体 (Circulation, 101, 1158, 2000) などがあげられる。

自己免疫疾患 (具体的な例としては、乾癬、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症など) に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己

DNA 抗体 (Immunol. Letters, 72, 61, 2000)、抗 CD11a 抗体、抗 ICAM3 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD2 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗インテグリン  $\alpha 4 \beta 7$  抗体、抗 CD40L 抗体、抗 IL-2 受容体抗体 (Immunology Today, 21, 403, 2000) などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 gp120 抗体

- 5 (Structure, 8, 385, 2000)、抗 CD4 抗体 (J. Rheumatology, 25, 2065, 1998)、抗 CCR4 抗体、抗ペロ毒素抗体 (J. Clin. Microbiol., 37, 396, 1999) などがあげられる。

抗体分子としては、抗体の Fc 領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc 領域を含む融合蛋白質などがあげられる。

- 10 抗体としては、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に生産される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものであればいかなるものでもよいが、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

- 15 ハイブリドーマは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得された B 細胞と、マウス、ラット等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を生産する細胞をいう。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

- 20 ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域は V 領域として HV または VH と称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL と称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH と称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CL と称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

- 25 ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

- 30 ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスの内いずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものをを用いることができる。

- 35 ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体をいう。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒ

ト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラス

5    クラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体生産トランスジェニック動物あるいはヒト抗体生産トランスジェニック植物から得られる

10    抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、BB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を生産するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリー

15    である。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体生産トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウス胚性幹細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該胚性幹細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体生産トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることに

20    ヒト抗体生産トランスジェニック動物を作製することもできる。ヒト抗体生産トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体生産ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を生産蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体

30    であることが好ましく、抗体のクラスが IgG のヒト抗体が好ましい。

抗体の断片とは、上記抗体の少なくとも Fc 領域の一部を含んだ断片をいう。Fc 領域とは、抗体の H 鎖の C 末端側の領域、CH2 領域および CH3 領域を意味し、天然型およびその変異型を包含する。少なくとも Fc 領域の一部とは、好ましくは CH2 領域を含む断片、より好ましくは CH2 領域内に存在する 1 番目のアスパラギン酸を含む領域をいう。IgG クラスの Fc 領域は、カバット (Kabat) らの EU Index[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・

35

インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 5<sup>th</sup> Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]のナンバリングで226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味する。抗体の断片としては、具体的には、H鎖の単量体、H鎖の2量体などがあげられる。

- 5 Fc領域を有する融合蛋白質としては、抗体のFc領域を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどの蛋白質とを融合させた物質（以下、Fc融合蛋白質と称す）であればいかなるものでもよい。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. 本発明の細胞の作製

- 10 本発明の細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

##### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の細胞は、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

- 15 遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、相同組換え法、RNA-DNA oligonucleotide (RDO) 法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

##### (a) 相同組換え法による本発明の細胞の作製

- 20 本発明の細胞は、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

- 染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)（以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す）、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社 (1995)（以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す）等に記載の染色体工学の手法を用い、例えば以下のように行うことができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のcDNAを取得する。

- 30 取得したcDNAの塩基配列に基づき、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノムDNAを調製する。  
該ゲノムDNAの塩基配列に基づき、改変する標的遺伝子（例えば、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子）を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

- 35 作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の2.に記載の細胞があげられる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のcDNA及びゲノムDNAを取得する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

#### cDNAの調製方法

各種宿主細胞から全RNA又はmRNAを調製する。

- 5 調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の既知アミノ酸配列、例えばヒトのアミノ酸配列、に基づいて、デジェネレティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

- 10 取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素をコードするcDNAを取得することができる。

- 各種宿主細胞のmRNAは、市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のごとく各種宿主細胞から調製してもよい。各種宿主細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全RNAからpoly(A)<sup>+</sup>RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) などがあげられる。

- 20 さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

- 次に、調製した各種宿主細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)を用いる方法などがあげられる。

- 30 cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 $\lambda$ TriplEx (Clontech社)、 $\lambda$ ExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、*Escherichia coli* XL1-Blue

MRF' [STRATAGENE 社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジ(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および Escherichia coli JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

この cDNA ライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げ、なるべく完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製した cDNA ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

$\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [ピーシーアール・プロトコルズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377 DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片を DNA プローブとして、各種宿主細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーに対してコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素の DNA を取得することができる。

また、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、各種宿主細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いてスクリーニングを行うことにより、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素の DNA を取得することもできる。

取得した  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードする DNA の塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM377 DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、



データベース中の遺伝子の中で GDP-マンノースを  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素をコードしている遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1、2、3 または 4 に記載の塩基配列があげられる。

- 5 決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素の cDNA を取得することもできる。

$\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

10 ゲノム DNA の調製方法

ゲノム DNA を調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA を単離することもできる。

- 15 上記の方法で得られる  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 9 に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES 細胞を用いた変異マウスの作製 (羊土社) 等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の 2. に記載の各種細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

- 25 相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES 細胞を用いた変異マウスの作製 (羊土社) 等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) や PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] 等
- 30 があげられる。

また、 $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標として、相同組換え体を取得することもできる。具体的な方法としては、例えば、以下に記載の形質転換体を選択する方法があげられる。

形質転換体を選択する方法

- 35  $\alpha$ -1, 6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖タンパク質 (東京化学同人) 日本生化学会編 (1988)], 文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社製) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸

監修 (1996) ]、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モ  
レキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などが  
あげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価す  
る方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定  
5 するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

また、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた結果生じる形質の変化  
を指標に細胞を選択する方法としては、例えば、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転  
換体を選択する方法や、細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する  
方法などがあげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法とし  
10 ては、後述の6.に記載の方法があげられる。細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として  
形質転換体を選択する方法としては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコ  
サミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選  
択する手法を挙げることができる。その具体的な例としては、ソマティック・セル・アンド・モ  
レキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51, (1986)等に記載のレク  
15 チンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位と  
フコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用い  
ることができるが、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、  
エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチンVFA  
20 (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia  
由来の Lectin) 等が好ましい。

具体的には、数十 $\mu$ g/ml~数mg/ml、好ましくは0.5~2.0mg/mlの濃度の  
上述のレクチンを含む培地にで1日~2週間、好ましくは3日~1週間培養し、生存している  
細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチ  
25 ンを含む培地で培養を続けることで、本発明の細胞を選択することができる。

#### (b) RDO法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を標的とし、RDO法を用い、例えば、  
以下のように作製することができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

30 調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素をコードする部分、非翻訳領域の  
部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素に  
変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の細胞を作製することができる。

35 宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする $\alpha$ -1,6-フコース修  
飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の  
2.に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述の2. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「cDNAの調製方法」などがあげられる。

- 5       $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の「ゲノムDNAの調製方法」などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー

- 10      (Sanger)らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該DNAの塩基配列を決定することができる。

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

- 15      RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、上記1の(1)の(a)に記載の、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」を用いることもできる。

- 20      RDOのコンストラクトは、サイエンス (Science), 273, 1386, (1996); ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 4, 285, (1998); ヘパトロジー (Hepatology), 25, 1462, (1997); ジーン・セラピー (Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジーン・セラピー (Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン (J. Mol. Med.), 75, 829, (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768, (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nuc. Acids. Res.), 27, 1323, (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー (Invest. Dermatol.), 111, 1172, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 16, 1343, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 18, 43, (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 18, 555, (2000)等の記載に従って設計することができる。

(c) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の細胞の作製

- 35      本発明の細胞は、ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genet.), 25, 35, (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子を、突然変異

を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

- 5 外来遺伝子としては、細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の2.に記載の宿主細胞があげられる。

- 10 細胞への遺伝子の導入には、後述の2.に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」があげられる。

- 15 (2) 酵素についての突然変異を導入する手法

本発明の細胞は、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

- 20 具体的には、1) 突然変異誘発処理で親株細胞を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株細胞を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、  
25 該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

- 突然変異誘発処理としては、親株細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いる  
30 ことができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版(朝倉書店)・日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

- 自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げる  
35 ことができる。

$\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標として所望の細胞株を選択する方法、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を

指標として所望の細胞株を選択する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載の、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素の活性の変化を指標とした「形質転換体を選択する方法」があげられる。

## 2. 抗体組成物を例とした糖蛋白質の製造方法

- 5 抗体組成物の製造を例に、本発明の細胞を用いた糖蛋白質の製造方法を示す。

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと略す)等に記載された方法を用い、例えば、以下のように抗体分子をコードする遺伝子を導入する宿主細胞中で発現させて取得することができる。

抗体分子のcDNAを調製する。

- 15 調整した抗体分子の全長cDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明の抗体組成物を生産する形質転換体を得ることができる。

- 20 cDNAは、上記1の(1)の(a)に記載の「cDNAの調製方法」に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマーを用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

- 25 プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等をあげることができる。

- 30 宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

- 35 組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、

プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平 3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)], pAS3-3 [特開平 2-227075]、pcDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)], pcDNA1/Amp (Invitrogen 社)、pREP4 (Invitrogen 社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平 2-227075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第 2606856、特許第 2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版] 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社) 等を用いることができる。

- 5 組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

- 10 植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Ti プラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

- 15 宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

- 20 組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) [特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭 60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc 領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

- 25 糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞等により発現させた場合には、導入した遺伝子によって所望の糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

- 30 酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

- 35 炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、な



らびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地[ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地[ヴュウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)]、199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地[発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地にインスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。フェドバッチ培養、ホロファイバー培養などの培養法を用いて1日～数ヶ月培養を行うこともできる。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405(いずれも JRH Biosciences 社)、Grace's Insect Medium[ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている

ムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する酵母、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平 05-336963、W094/23021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入した後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体(トランスジェニック非ヒト動物)または植物個体(トランスジェニック植物)を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法[アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオテクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)]に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取

することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia 社) 等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合蛋白質などを挙げることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体およびFc融合蛋白質の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物等の糖蛋白質を上述の方法および当該方法に準じて取得することもできる。

#### A. ヒト化抗体組成物の製造

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC $\gamma$ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の $\kappa$ クラスのC領域（以下、hC $\kappa$ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

### (2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ

単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

- 5      ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。
- 10

- cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。
- 15

- cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λzap II (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。
- 20
- 25

- ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。
- 30

- cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。
- 35

また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR 法と表記する；モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] により H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

#### (3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H 鎖及び L 鎖 V 領域の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することによって見出すことができる。

#### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項 2 の A の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖及び L 鎖 V 領域の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを本項 2 の A の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の CDR を移植するヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のフレームワーク（以下、FR と表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖の V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60% 以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さから成る数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率及び合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の A の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、本項 2 の A の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の CDR のみをヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外



の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている【バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)】。

ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析【ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 112, 535 (1977)】或いはコンピューターモデリング【プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501 (1994)】等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて本項 2 の A の (5) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について本項 2 の A の (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

本項 2 の A の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流に、本項 2 の A の (5) 及び (6) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項 2 の A の (5) 及び (6) でヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖及び L 鎖 V 領域を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項 2 の A の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖及び L 鎖 C 領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (8) ヒト化抗体の安定的生産

本項 2 の A の (4) 及び (7) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型 CDR 移植抗体（以下、併せてヒト化抗体と称す）を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法【特開平 2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)】等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr<sup>-</sup>細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、1. に記載の細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表記する; SIGMA 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地にインスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA 法と表記する; アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] 等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する; ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] 等で測定することができる。

## B. Fc 融合蛋白質の製造

### (1) Fc 融合蛋白質発現用ベクターの構築

Fc 融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子をクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の Fc 領域としては、CH2 と CH3 領域を含む領域のほか、ヒンジ領域、CH1 の一部が含まれるものも包含される。また CH2 または CH3 の少なくとも 1 つのアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入され、実質的に Fc $\gamma$  受容体への結合活性を有するものであればいかなるものでもよい。

ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。それら遺伝子とFc領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、PCR法（モレキュラー・クローニング第2版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Supplement 1-34）を行うことがあげられる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

## (2) ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAの取得

ヒト抗体のFc領域と融合させる蛋白質とをコードするDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のFcと融合させる蛋白質を発現している細胞や組織よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、目的の蛋白質の遺伝子配列部分をプローブとして用い、目的の蛋白質をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドを単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の蛋白質の全塩基配列を決定し、塩基配列より全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、細胞や組織を摘出することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

細胞や組織から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クローニング第2版）等があげられる。また、細胞や組織からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法（モレキュラー・クローニング第2版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Supplement 1-34）、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid

Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zapII (Stratagene 社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからの目的の蛋白質をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法により目的の蛋白質をコードする cDNA を調製することもできる。

目的の蛋白質をヒト抗体の Fc 領域と融合させる方法としては、PCR 法があげられる。例えば、目的の蛋白質の遺伝子配列の 5' 側と 3' 側に任意の合成オリゴ DNA (プライマー) を設定し、PCR 法を行い PCR 産物を取得する。同様に、融合させるヒト抗体の Fc 領域の遺伝子配列に対しても任意のプライマーを設定し、PCR 産物を得る。このとき、融合させる蛋白質の PCR 産物の 3' 側と Fc 領域の PCR 産物の 5' 側には同じ制限酵素部位もしくは同じ遺伝子配列が存在するようにプライマーを設定する。この連結部分周辺のアミノ酸改変が必要である場合には、その変異を導入したプライマーを用いることで変異を導入する。得られた 2 種類の PCR 断片を用いてさらに PCR を行うことで、両遺伝子を連結する。もしくは、同一の制限酵素処理をした後にライゲーションすることでも連結することができる。

上記方法により連結された遺伝子配列を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から Fc 融合蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、目的のアミノ酸配列と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む Fc 融合蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

### (3) Fc 融合蛋白質の安定的生産

5 前記の (1) 項に記載の Fc 融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞への Fc 融合蛋白質発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

10 Fc 融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、Fc 融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、前記 1. 項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。

15 Fc 融合蛋白質発現ベクターの導入後、Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地にインスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に Fc 融合蛋白質を生産蓄積させることができる。培養上清中の Fc 融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性は ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 遺伝子増幅系等を利用して Fc 融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

20 Fc 融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムやプロテイン G カラムを用いて精製することができる (アンチボディズ, Chapter 8, モノクローナル・アンティボディズ)。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した Fc 融合蛋白質分子全体の分子量は、SDS-PAGE [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12, モノクローナル・アンティボディズ) 等で測定することができる。

30 以上、動物細胞を宿主とした抗体および Fc 融合蛋白質の組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても製造することができる。

既に、抗体分子等の糖蛋白質を発現する能力を有している細胞の場合には、上記 1. に記載の方法を用いて糖蛋白質生産細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする

抗体組成物や糖蛋白質組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物や糖蛋白質組成物を製造することができる。

### 3. 無血清培養による本発明の糖蛋白質組成物の製造法

本発明の細胞は、さらに無血清培地へ馴化させる必要がある。本発明の細胞を用いて、糖蛋白質の製造を行なうことにより、無血清あるいは無蛋白培地の糖蛋白質組成物の製造が可能である。

本発明の無血清培地への馴化方法としては、血清を含有する培地で継代した $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞を、市販の無血清培地等へ直接馴化させる方法や連続馴化させる方法 (Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, JOHON WILEY & SONS 2C:1) 等があげられる。以下に、その具体的な例をあげる。

無血清馴化中には細胞の生存率が一時的に低下し、細胞が死滅してしまうことがある。このため、細胞の生存率を戻し、あるいは高く維持するためには、無血清馴化培地への細胞接種時に細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ml、好ましくは $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種することが好ましい。例えば、直接馴化法では、培地中に細胞を接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターでのバッチ培養等、通常の動物細胞の培養方法を用いて培養し、細胞濃度が $10 \times 10^5 \sim 40 \times 10^5$ 細胞/mlに達したら、無血清培地中に細胞を接種し、同様な条件で培養を繰り返す。

無血清培地に $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞を $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ml、好ましくは $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種し、通常の動物細胞の培養方法を用いて4～7日後に、細胞密度が $10 \times 10^5 \sim 40 \times 10^5$ 細胞/mlに達した細胞を無血清培地に馴化した細胞として選択する。

無血清培地に馴化した細胞は、細胞濃度が下記のバッチ培養で用いられる培地中に $10 \times 10^5 \sim 30 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種し、下記のバッチ培養で用いられる培養条件で3～5日間培養して、継代培養を行うことができる。なお、継代培養の期間中、無血清培地に馴化した細胞の生存率は、90%以上に維持しておくことが望ましい。また、 $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞、例えば、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼのゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞または該細胞の形質転換細胞について、無血清培地に馴化した細胞が所望の糖蛋白質の生産性を維持するためには、アルブミンを好ましくは0.1～10 g/L、さらに好ましくは0.5～3 g/Lとなるように無血清培地へ添加しておくことよい。

本発明の無血清培地への馴化方法を用いて細胞を無血清馴化させた後、96ウエルプレートによる限界希釈方法、コロニー形成方法等を用いることにより、クローン（単一細胞）化した細胞株を調製することができる。

以下に、限界希釈法を用いたクローン化した細胞株を調製する方法を示す。

細胞懸濁液を希釈し、ひとつのウエルに1個以下の確率で細胞が入るように接種し、市販の無血清培地などを用いて、 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で数週間培養する。培養終了後、細胞増殖の認められた細胞の培養上清中の所望の糖蛋白質の濃度を調べ、該糖蛋白質の生産性の高い細胞を選択する。

コロニー形成方法を用いてクローン化する方法は以下のとおりである。

付着性細胞の場合は、細胞懸濁液を希釈し、シャーレに細胞を接種して培養後、コロニーの形成を確認する。ペニシリンキャップ等のリングでコロニーを分離し、トリプシン等の酵素で細胞を分離後、適当な培養器に移し、所望の糖蛋白質の生産量を調べ、該糖蛋白質の生産性の高い細胞を選択する。

浮遊細胞の場合は、細胞懸濁液を希釈し、軟寒天中に細胞を接種して培養し、生じたコロニーを顕微鏡下でピックアップした後、静置培養に戻して所望の糖蛋白質の生産量を調べ、生産性の高い細胞を選択する。

上記方法を繰り返して行なうことで、無血清に馴化され、かつ目的とする細胞特性を持ったクローン化された $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞株を選択することができる。

上記方法により、無血清培地に馴化した $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞株を得ることができる。

無血清培地に馴化した $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞株は、上記の無血清培地に馴化した細胞を継代培養する方法で継代培養することができる。本発明の無血清培地への馴化方法を用いて無血清培地に馴化した $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞としては、WK704-2B8P (FERM BP-8337)、WK704-2871 (FERM BP-8336)、WK704-2760 (FERM BP-8335) を無血清培地に馴化した細胞などがあげられる。

なお、本発明の無蛋白培地での細胞の馴化方法についても、上述の無血清培地での細胞の馴化方法と同様の方法で行うことができる。

本発明の細胞を培養する方法としては、所望の糖蛋白質組成物を効率よく生産できる培養方法であれば、通常用いられる動物細胞の培養法のいずれでも用いることができる。例えば、バッチ培養、リピーバッチ培養、フェドバッチ培養、パーフュージョン培養等があげられるが、所望の糖蛋白質の生産性を高めるにはフェドバッチ培養またはパーフュージョン培養が好ましい。

#### (1) バッチ培養

本発明の細胞の培養方法において用いられる無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され、かつ動物細胞が同化しうる炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。

具体的には、RPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、F12培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)]、IMDM培地 [J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)] 等があげられるが、好ましくは、DMEM培地、F12培地、IMDM培地等が用いられる。

無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な栄養因子、生理活性物質等を添加する。これらの添加物は、培養前に予め培地に含有させる。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。



アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサル、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

栄養因子の濃度として、グルコースの濃度は200~6000mg/L、好ましくは3000~5000mg/Lである。

アミノ酸の濃度は、例えば、L-アラニン1~160mg/L（好ましくは3~120mg/L）、L-アルギニン塩酸10~1000mg/L（好ましくは30~800mg/L）、L-アスパラギン水和物10~200mg/L（好ましくは20~150mg/L）、L-アスパラギン酸5~100mg/L（好ましくは10~75mg/L）、L-シスチン二塩酸10~200mg/L（好ましくは20~150mg/L）、L-グルタミン酸5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-グルタミン50~2000（好ましくは100~1500mg/L）、グリシン2~100mg/L（好ましくは5~75mg/L）、L-ヒスチジン塩酸二水和物5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-イソロイシン2~300mg/L（好ましくは4~200mg/L）、L-ロイシン5~300mg/L（好ましくは10~200mg/L）、L-リジン塩酸10~300mg/L（好ましくは20~250mg/L）、L-メチオニン5~100mg/L（好ましくは10~75mg/L）、L-フェニルアラニン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-プロリン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-セリン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-スレオニン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-トリプトファン1~40mg/L（好ましくは2~30mg/L）、L-チロシン二ナトリウム二水和物2~300mg/L（好ましくは4~200mg/L）、L-バリン5~300mg/L（好ましくは10~200mg/L）である。

ビタミンの濃度は、例えば、d-ビオチン0.001~0.4mg/L（好ましくは0.002~0.3mg/L）、D-パントテン酸カルシウム0.001~10.0mg/L（好ましくは0.002~7.5mg/L）、塩化コリン0.1~20.0mg/L（好ましくは0.2~15.0mg/L）、葉酸0.005~20.0mg/L（好ましくは0.01~15.0mg/L）、myo-イノシトール0.01~300mg/L（好ましくは0.05~200mg/L）、ナイアシンアミド0.01~20.0mg/L（好ましくは0.02~15.0mg/L）、ピリドキサル塩酸0.01~15.0mg/L（好ましくは0.02~10.0mg/L）、リボフラビン0.005~2.0mg/L（好ましくは0.01~1.5

mg/L)、チアミン塩酸0.005~20.0mg/L(好ましくは0.01~15.0mg/L)、シアノコバラミン0.001~5.0mg/L(好ましくは0.002~3.0mg/L)である。

生理活性物質の濃度は、例えば、インスリン10~500mg/L、好ましくは50~300mg/L、インスリン様増殖因子10~500mg/L、好ましくは50~300mg/L、トランスフェリン10~500mg/L、好ましくは50~300mg/L、アルブミン200~6000mg/L、好ましくは700~4000mg/Lである。

バッチ培養は、通常pH6~8、30~40℃等の条件下で3~12日間行う。また、培養中に必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

## (2) フェドバッチ培養

本発明の細胞の培養方法において使用される無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され且つ通常動物細胞が同化しうる炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。具体的には、RPMI 1640培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地[Virology, 8, 396 (1959)]、199培地[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、F12培地[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)]、IMDM培地[J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)]等があげられるが、好ましくは、DMEM培地、F12培地、IMDM培地等が用いられる。上記培地以外に、バッチ培養で記載した無血清培地を用いてもよい。

無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な生理活性物質、栄養因子等を添加する。これらの添加物は、予め培養前に培地に含有させるか、または必要に応じて、培養中に培養液へ適宜追加供給する。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

培地または培養液中への栄養因子の最終添加量として、グルコースは200~6000mg/L、好ましくは1000~5000mg/Lである。

アミノ酸は、例えば、L-アラニン1~960mg/L（好ましくは1~640mg/L）、  
L-アルギニン-塩酸10~6000mg/L（好ましくは11~4000mg/L）、L-  
アスパラギン-水和物10~1200mg/L（好ましくは11~800mg/L）、L-ア  
スパラギン酸5~600mg/L（好ましくは5~400mg/L）、L-シスチン二塩酸1  
5 0~1200mg/L（好ましくは11~800mg/L）、L-グルタミン酸5~1200  
mg/L（好ましくは5~800mg/L）、L-グルタミン53~12000（好ましくは  
55~8000mg/L）、グリシン2~600mg/L（好ましくは2~400mg/L）、  
L-ヒスチジン-塩酸二水和物5~1200mg/L（好ましくは5~800mg/L）、L-  
イソロイシン4~1800mg/L（好ましくは4~1200mg/L）、L-ロイシン1  
10 3~1800mg/L（好ましくは14~1200mg/L）、L-リジン-塩酸10~18  
00mg/L（好ましくは11~1200mg/L）、L-メチオニン4~600mg/L（好  
ましくは5~400mg/L）、L-フェニルアラニン5~1200mg/L（好ましくは5  
~800mg/L）、L-プロリン5~1200mg/L（好ましくは5~800mg/L）、  
L-セリン5~1200mg/L（好ましくは5~800mg/L）、L-スレオニン5~1  
15 200mg/L（好ましくは5~800mg/L）、L-トリプトファン1~240mg/L  
（好ましくは1~160mg/L）、L-チロシンナトリウム二水和物8~1800mg/  
L（好ましくは8~1200mg/L）、L-バリン12~1800mg/L（好ましくは1  
2~1200mg/L）である。

ビタミンは、例えば、d-ビオチン0.001~2.4mg/L（好ましくは0.001~  
20 1.6mg/L）、D-パントテン酸カルシウム0.011~60mg/L（好ましくは0.  
011~40mg/L）、塩化コリン0.11~90mg/L（好ましくは0.11~60m  
g/L）、葉酸0.01~120mg/L（好ましくは0.01~80mg/L）、myo-  
イノシトール0.05~1800mg/L（好ましくは0.05~1200mg/L）、ナイ  
アシンアミド0.02~120mg/L（好ましくは0.03~80mg/L）、ピリドキザ  
25 ール-塩酸0.02~90mg/L（好ましくは0.03~60mg/L）、リボフラビン0.  
01~12mg/L（好ましくは0.01~9.8mg/L）、チアミン-塩酸0.01~12  
0mg/L（好ましくは0.01~80mg/L）、シアノコバラミン0.001~30mg  
/L（好ましくは0.001~20mg/L）である。

培地または培養液中への生理活性物質の最終添加量として、例えば、インスリン10~30  
30 00mg/L、好ましくは11~2000mg/L、インスリン様増殖因子10~3000m  
g/L、好ましくは11~2000mg/L、トランスフェリン10~3000mg/L、好  
ましくは11~2000mg/L、アルブミン200~36000mg/L、好ましくは22  
0~24000mg/Lである。

本発明の細胞の培養方法において物質の「最終添加量」は、フェドバッチ培養中に添加する  
35 濃縮培養液を最終的に添加し終わった後、培地に含まれる該物質の重量と培養液中に添加した  
該物質の重量との合計量を、培地量と添加した濃縮培養液量との合計量で除した値として表わ  
される。

5      フェドバッチ培養においては、生理活性物質、栄養因子等は通常に使用される濃度よりも高い濃度で添加することが好ましい。例えば、培養液量の  $1/30 \sim 1/3$  好ましくは  $1/20 \sim 1/5$  を一回分として添加する。培養液中に添加する場合は、培養期間中、連続的にまたは数回～十数回に分けて追加供給することが好ましい。生理活性物質、栄養因子等を連続的、または間欠的に少量ずつ追加供給する上記フェドバッチ培養法は、細胞の代謝効率が高く、培養液中の老廃物が蓄積されることによる培養細胞の到達細胞密度の低下を防止することができ、また、回収された培養液中の所望の糖蛋白質の濃度はバッチ培養法に比べて高濃度であるため、該糖蛋白質の分離・精製が容易になり、バッチ培養に比べ、培地当りの該糖蛋白質の生産量を増大させることができる。

- 10      フェドバッチ培養は、通常 pH 6～8、 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$  で、 $3 \sim 12$  日間行う。また、培養中に必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH 制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

### (3) パーフュージョン培養

- 15      本発明の細胞の培養方法において使用される無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され且つ通常動物細胞が同化しうる炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。具体的には、RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、  
20      199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、F12 培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965)]、IMDM 培地 [J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)] 等があげられるが、好ましくは、DMEM 培地、F12 培地、IMDM 培地等が用いられる。上記培地以外に、バッチ培養で記載した無血清培地を用いてもよい。

- 25      無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な生理活性物質、栄養因子等を添加する。これらの添加物は、培養前の培地または培養液中に供給する培地に含有させておくともよい。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。

- 30      アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1 種または 2 種以上組み合わせて用いられる。

- 35      ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1 種または 2 種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

栄養因子の濃度として、グルコースの濃度は500～6000mg/L、好ましくは1000～2000mg/Lにコントロールされる。

栄養因子としては、アミノ酸、ビタミン等があげられる。他の生理活性物質または栄養因子の添加量は、例えば、インスリン4～560mg/L、好ましくは20～360mg/L、インスリン様増殖因子4～560mg/L、好ましくは20～360mg/L、トランスフェリン4～560mg/L、好ましくは20～360mg/L、アルブミン80～6500mg/L、好ましくは280～4500mg/Lである。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。アミノ酸濃度は、例えば、L-アラニン1～200mg/L（好ましくは2～160mg/L）、L-アルギニン塩酸10～1140mg/L（好ましくは30～940mg/L）、L-アスパラギン水和物10～250mg/L（好ましくは20～200mg/L）、L-アスパラギン酸5～148mg/L（好ましくは10～120mg/L）、L-シスチン二塩酸10～350mg/L（好ましくは20～300mg/L）、L-グルタミン酸5～320mg/L（好ましくは10～270mg/L）、L-グルタミン50～3300（好ましくは100～1800mg/L）、グリシン2～148mg/L（好ましくは5～123mg/L）、L-ヒスチジン塩酸二水和物5～270mg/L（好ましくは10～220mg/L）、L-イソロイシン4～470mg/L（好ましくは4～370mg/L）、L-ロイシン10～470mg/L（好ましくは13～370mg/L）、L-リジン塩酸10～530mg/L（好ましくは20～480mg/L）、L-メチオニン4～150mg/L（好ましくは4～120mg/L）、L-フェニルアラニン4～310mg/L（好ましくは4～260mg/L）、L-プロリン5～270mg/L（好ましくは10～210mg/L）、L-セリン5～270mg/L（好ましくは10～220mg/L）、L-スレオニン5～350mg/L（好ましくは10～300mg/L）、L-トリプトファン1～65mg/L（好ましくは2～55mg/L）、L-チロシン二ナトリウム二水和物4～470mg/L（好ましくは8～370mg/L）、L-バリン10～450mg/L（好ましくは11～350mg/L）である。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。ビタミンの最終添加量は、例えば、d-ビオチン0.001～0.44mg/L（好ましくは0.02～0.34mg/L）、D-パントテン酸カルシウム0.01～16mg/L（好ましくは0.02～14mg/L）、塩化コリン0.1～21mg/L（好ましくは30.2～16mg/L）、葉酸0.01～26mg/L（好ましくは0.01～21mg/L）、myo-イノシトール0.05～310mg/L（好ましくは0.05～211mg/L）、ナイアシンアミド0.02～26mg/L（好ましくは0.02～21mg/L）、ピリドキサール塩酸0.

0.2~2.1 mg/L (好ましくは0.02~1.6 mg/L)、リボフラビン0.01~2.6 mg/L (好ましくは0.01~2.1 mg/L)、チアミン塩酸0.01~2.6 mg/L (好ましくは0.01~2.1 mg/L)、シアノコバラミン0.001~5 mg/L (好ましくは0.002~3 mg/L)である。

- 5 本発明の細胞の培養方法において培養液は、通常使われている培養液と細胞を分離する装置により効率的に分離され、濃縮された細胞液が元の培養槽に戻り、減少した分の新鮮培地が新たに供給される。このことにより常に培養環境が良好に保たれる。

- 本発明の細胞の場合、新鮮培地での培地交換率とは別に、増殖する細胞を細胞の増殖率に合わせて、培養系の外へ捨てることによって培養系を安定させ、所望の糖蛋白質の生産性を高めることができる。例えば、細胞を系外へ捨てる速度を細胞増殖率に合わせて、目的とする細胞密度が維持されるよう細胞の倍加時間に培養槽にある全細胞の2/5~3/5を系外に出すことにより生産性の高い培養が可能となる。

- 10 本発明において培養は、通常pH 6~8、30~40℃等の条件下で10~40日間行う。また、培養中に必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

上記のとおり、本発明の $\alpha$ -1,6-フコース修飾酵素のゲノム遺伝子がソックアウトされた細胞を培養し、所望の糖蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該糖蛋白質を採取することにより、該糖蛋白質を製造することができる。

- 20 本発明の細胞の培養方法において、細胞を増殖させる場合には、培養液中のインスリン濃度を1.0 mg/L以上、好ましくは2.0 mg/L以上に維持して培養することが好ましい。一方、所望の糖蛋白質を生産させる場合には、例えば培養液中のインスリン濃度を、1.0 mg/L以下、好ましくは0.5 mg/L以下に維持して培養することが好ましい。なお、前培養において培地中にインスリンが含まれていれば、抗体の生産性を高めるために、インスリンは添加しなくてよいが、通常は培養液中にインスリン濃度を0.01~1.0 mg/L、好ましくは0.01~0.5 mg/Lになるように維持することが好ましい。

培養液中のインスリン濃度を調節する方法は、インスリンの濃度調整が可能である培養、例えばフェドバッチ培養、パーフージョン培養等の培養方法において、好適に用いられる。

- 30 なお、細胞の培養方法についても、血清、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリン、アルブミン等の蛋白質を添加しない培地を用いて、上述の方法に従って、無血清培地での培養方法と同様の方法を行なうことができる。当該培養方法により、所望の糖蛋白質組成物を製造することができる。

#### 4. 糖蛋白質組成物の活性評価

- 35 精製した糖蛋白質組成物の蛋白量、受容体との親和性、血液中での半減期、血液投与後の組織への分布、あるいは薬理活性発現に必要な蛋白質相互作用の変化を測定する方法としては、Current Protocols In Protein Science, John Wiley & Sons Inc., (1995)、日本生化学会編 新生化学実験講座 19 動物実験法、東京化学同人 (1991)、日本生化学会編 新生化学実験講座 8 細胞内情報と細胞応答、東京化学同人 (1990)、日本生化学会編 新生化学実験講座 9 ホルモン I

ペプチドホルモン、東京化学同人（1991）、実験生物学講座 3 アイソトープ実験法、丸善株式会社（1982）、Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., (1995)、酵素免疫測定法第3版、医学書院（1987）、改訂版 酵素抗体法、学際企画（1985）等に記載の公知の方法を用いることができる。

- 5     その具体的な例としては、精製した糖蛋白質組成物をラジオアイソトープなどの化合物で標識し、標識した糖蛋白質組成物の受容体あるいは相互作用をする蛋白質との結合反応の強さを定量的に測定する方法があげられる。また、Biacore 社の BIAcore シリーズなどの各種装置を用いて、蛋白質蛋白質相互作用を測定することもできる（J. Immunol. Methods, 145, 229 (1991)、実験医学別冊 バイオマニュアルUPシリーズ タンパク質の分子間相互作用実験法、羊土社（1996））。

標識した糖蛋白質を体内に投与することで、血液中での半減期あるいは血液投与後の組織への分布を知ることができるが、標識体の検出には、標識物質を検出する方法と検出の対象となる糖蛋白質特異的な抗体抗原反応を組み合わせた系が好ましい。

#### 5. 抗体組成物の活性評価

- 15     糖蛋白質組成物が抗体組成物である場合、精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合性あるいはエフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディス、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA 法及び蛍光抗体法【キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Cancer Immunol. Immunother.）, 36, 373 (1993)】等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる【キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー（Cancer Immunol. Immunother.）, 36, 373 (1993)】。

- 20     また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

#### 6. 糖蛋白質組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた糖蛋白質組成物の糖鎖構造は、通常の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG 分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

##### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

糖蛋白質組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

- 35     具体的な方法として、Dionex 社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法があげられる。BioLC は HPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法【ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.) , 6, 1577 (1983)】によって糖組成を分析する装置である。



また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法〔アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agruc. Biol. Chem.), 55(1), 283-284 (1991)〕に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジンで蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

## 5 (2) 糖鎖構造解析

糖蛋白質組成物の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法〔アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)〕により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、糖蛋白質組成物をヒドラジン分解して糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)〕を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製)、文献〔アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)〕とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

## 7. 糖蛋白質組成物の利用

本発明により製造される糖蛋白質組成物は、フコースが結合していない糖鎖構造を有しており、例えば、受容体との親和性の向上、血中半減期の向上、血中投与後の組織分布の改善、または薬理活性発現に必要な蛋白質との相互作用の向上などの効果が期待でき高い生理活性を示す。特に、抗体組成物の場合は、高いエフェクター機能、すなわちADCC活性を有している。これら生理活性の高い糖蛋白質、特に高いADCC活性を有する抗体組成物は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウィルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍では癌細胞が増殖している。通常抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いADCC活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分な場合が多く化学療法との併用療法が行われているが〔サイエンス (Science), 280, 1197, 1998〕、本発明により製造される抗体組成物は高い抗腫瘍効果を有するため、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもつながる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それら疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いADCC活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウィルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を、高い抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を用いて抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患を予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウィルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 (Anticancer Res., 13, 331, 1993)、抗 GD3 抗体 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 260, 1993)、抗 GM2 抗体 (Cancer Res., 54, 1511, 1994)、抗 HER2 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285, 1992)、抗 CD52 抗体 (Nature, 332, 323, 1988)、抗 MAGE 抗体 (British J. Cancer, 83, 493, 2000)、抗 HM1.24 抗体 (Molecular Immunol., 36, 387, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Cancer, 88, 2909, 2000)、抗 FGF8 抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9911, 1989) 抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 FGF8 受容体抗体 (J. Biol. Chem., 265, 16455, 1990)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647, 1995)、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 (J. Neurosci. Res., 40, 647, 1995)、抗 PMSA 抗体 (J. Urology, 160, 2396, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Cancer Res., 57, 4593, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Oncogene, 19, 2138, 2000)、抗 CA125 抗体、抗 17-1A 抗体、抗インテグリン  $\alpha v \beta 3$  抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD22 抗体、抗 HLA 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD19 抗体、抗 EGF 受容体抗体 (Immunology Today, 21, 403, 2000)、抗 CD10 抗体 (American Journal of Clinical Pathology, 113, 374, 2000) などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5, 1992)、抗インターロイキン 6 受容体抗体 (Molecular Immunol., 31, 371, 1994)、抗インターロイキン 5 抗体 (Immunol. Rev., 127, 5, 1992)、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体 (Cytokine, 3, 562, 1991)、抗インターロイキン 4 受容体抗体 (J. Immunol. Meth., 217, 41, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Hybridoma, 13, 183, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Molecular Pharmacol., 58, 237, 2000)、抗 CCR4 抗体 (Nature, 400, 776, 1999)、抗ケモカイン抗体 (J. Immunol. Meth., 174, 249, 1994)、抗ケモカイン受容体抗体 (J. Exp. Med., 186, 1373, 1997)、抗 IgE 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD11a 抗体 (Immunology Today, 21, 403, 2000)、抗 CCR2 抗体 (J. Immunol., 162, 1278, 1999)、抗 CCR8 抗体 (W099/25734)、抗 CCR3 抗体 (US6207155) などがあげられる。

循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 GpIIb/IIIa 抗体 (J. Immunol., 152, 2968, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Science, 253, 1129, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (J. Biol. Chem., 272, 17400, 1997) または抗血液凝固因子抗体 (Circulation, 101, 1158, 2000) などがあげられる。

自己免疫疾患（具体的な例としては、乾癬、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症など）に関連する抗原を認識する抗体としては、抗自己DNA抗体（Immunol. Letters, 72, 61, 2000）、抗CD11a抗体、抗ICAM3抗体、抗CD80抗体、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗インテグリン $\alpha 4\beta 7$ 抗体、抗CD40L抗体、抗IL-2受容体抗体（Immunology Today, 21, 403, 2000）などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗gp120抗体（Structure, 8, 385, 2000）、抗CD4抗体（J. Rheumatology, 25, 2065, 1998）、抗CCR4抗体、抗ペロ毒素抗体（J. Clin. Microbiol., 37, 396, 1999）などがあげられる。

上記抗体は、ATCC（The American Type Culture Collection）、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社から入手することができる。

本発明の糖蛋白質組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、糖蛋白質製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、糖蛋白質組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカガオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該糖蛋白質組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該糖蛋白質組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該糖蛋白質組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

5 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg~20mg/kgである。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

10 CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、プラスミド pKOFUT8Neo の構築を示した図である。

15 図2は、プラスミド pBs-2B8L の構築を示した図である。

図3は、プラスミド pBs-2B8H およびプラスミド pBs-2B8Hm の構築を示した図である。

図4は、プラスミド pKANTEX2B8P の構築を示した図である。

20 図5は、CHO/DG44 細胞由来 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト株より精製した抗 CD20 キメラ抗体のヒト B リンパ球培養細胞株 Raji に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

図6は、無蛋白培地馴化細胞を無蛋白培地で継代した際の、生細胞密度、生存率の推移を示したものである。

図7は、無蛋白培地馴化細胞のフェドバッチ培養における、生細胞密度、生存率の推移を示したものである。

25 図8は、無血清培地に馴化した Ms704/CD20 株を用いて浮遊攪拌リアクター無血清フェドバッチ培養を行った際の、生細胞密度(A)、細胞生存率(B)、累積生細胞密度(C)、抗体濃度(D)の推移を示した図である。各グラフの横軸は、培養開始後の培養日数を示す。

30 図9は、精製した2種類の抗 CD20 ヒト型キメラ抗体の、ヒト末梢血中での B 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。グラフ縦軸に、リンパ球画分中の CD2 陰性 CD19 陽性ヒト B 細胞の比率、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○は無血清培地に馴化した Ms704/CD20 株を用い浮遊攪拌リアクター無血清フェドバッチ培養法にて製造した抗 CD20 ヒト型キメラ抗体 (Ms704/CD20 抗体)、●は親株である CHO/DG44 細胞で製造した抗 CD20 ヒト型キメラ抗体 (DG44/CD20 抗体) の活性をそれぞれ示す。

35 図10は、精製した2種類の抗 CD20 ヒト型キメラ抗体の、WIL2-S 細胞に対する *in vitro* ADCC 活性を示した図である。グラフ縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○は Ms704/CD20 抗体、●は DG44/CD20 抗体の活性をそれぞれ示す。

図11は、3.7ng/mL の Ms704/CD20 抗体に 0~300ng/mL の DG44/CD20 抗体を添加して調製した抗 CD20 ヒト型キメラ抗体組成物の、WIL2-S 細胞に対する *in vitro* ADCC 活性を示した図である。

グラフ縦軸に細胞傷害活性、横軸に添加した DG44/CD20 抗体の抗体濃度をそれぞれ示す。図中の※は、フコース非結合型糖鎖を有する抗体の割合が 20%以上の抗体組成物を示す。

図 12 は、Ms704/CD20 抗体のみからなる抗体組成物と、Ms704/CD20 抗体に 9 倍量の DG44/CD20 抗体を混合した抗体組成物の、WIL2-S 細胞に対する *in vitro* ADCC 活性を示した図である。グラフ縦軸に細胞傷害活性を示す。グラフ横軸に示した数値は、上段から Ms704/CD20 抗体の濃度、添加した DG44/CD20 抗体の濃度、総抗体濃度をそれぞれ示す。□は Ms704/CD20 抗体のみからなる抗体組成物、■は Ms704/CD20 抗体に 9 倍量の DG44/CD20 抗体を混合した抗体組成物の活性を示す。

10 発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1 ゲノム上に存在する全ての FUT8 遺伝子を破壊した CHO/DG44 細胞の造成

15  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失した CHO/DG44 細胞株を以下の手順で造成した。

1. チャイニーズハムスターFUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Neo の構築

20 W002/31140 の実施例 13 の 1 項に記載の方法により構築したチャイニーズハムスターFUT8 遺伝子エクソン 2 ターゲティングベクタープラスミド pKOFUT8Puro およびプラスミド pK0SelectNeo (Lexicon 社製)を用いて、以下の様にしてプラスミド pKOFUT8Neo を構築した。

25 プラスミド pK0SelectDT (Lexicon 社製) 1.0  $\mu$ g を 16 単位の制限酵素 *Asc*I (New England Biolabs 社製)を用いて 37℃で 2 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製)を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約 1.6Kb の *Asc*I 断片を回収した。

次に、プラスミド pKOFUT8Puro 1.0  $\mu$ g を 16 単位の制限酵素 *Asc*I (New England Biolabs 社製)を用いて 37℃で 2 時間反応させた。消化反応後、大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)を用いて、添付の説明書に従い、DNA 末端を脱リン酸化させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を用いて、DNA 断片を回収した。

30 上記で得たプラスミド pK0SelectNeo 由来の *Asc*I 断片 (約 1.6Kb) 0.1  $\mu$ g とプラスミド pKOFUT8Puro 由来の *Asc*I 断片 (約 10.1Kb) 0.1  $\mu$ g に滅菌水を加えて 5  $\mu$ L とし、Ligation High (東洋紡社製) 5  $\mu$ L を加えて 16℃で 30 分間反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する図 1 に示したプラスミド pKOFUT8Neo を得た。該プラスミドは CHO 細胞の FUT8 遺伝子ノックアウト細胞を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

## 2. ゲノム上の FUT8 遺伝子を 1 コピー破壊した CHO 細胞の作製

### (1) ターゲティングベクター pKOFUT8Neo 導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO/DG44 細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に対し、実施例 1 の 1 項で構築したチャイニーズハムスター FUT8 ゲノム領域ターゲティングベクター pKOFUT8Neo を以下の  
5 様にして導入した。

プラスミド pKOFUT8Neo 280  $\mu$ g を 400 単位の制限酵素 SalI (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 5 時間反応させて直線状化した後、4  $\mu$ g を  $1.6 \times 10^6$  細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT (1) [透析 FBS (インビトロジェン社製) を 10%, HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用 10cm デッシュ (Falcon 社製) へ播種した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養後、G418 (ナ  
10 カライテスク社製) を 600  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10) [透析 FBS を 10% で含む IMDM 培地] 10mL に培地交換した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を  
15 行い、G418 耐性クローンを取得した。

### (2) ゲノム PCR による相同組換えの診断

本項 (1) で取得した G418 耐性クローンに対し、ゲノム PCR による相同組換えの診断を以下の様にして行った。

96 穴プレートに得た G418 耐性クローンに対しトリプシン処理を行った後、2 倍量の凍結培地  
20 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、600  $\mu$ g/mL G418 を含む IMDM-dFBS (10) を用いて 1 週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・  
25 バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200  $\mu$ g/mL RNase A] 30  $\mu$ L に一晩溶解した。

ゲノム PCR に用いるプライマーは以下のように設計した。まず、W002/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域 (配列番号 9) のうち、ターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 10 または配列番号 11) およびベ  
30 クター内配列に結合するプライマー (配列番号 12 または配列番号 13) を調製した。それらを用いて、以下のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。即ち、上記で調製したゲノム DNA 溶液を各々 10  $\mu$ L 含む 25  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (フォワードプライマーは  
35 配列番号 10 または配列番号 11、リバープライマーは配列番号 12 または配列番号 13) ] を調製し、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとした条件で PCR を行った。

PCR 後、反応液を 0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、CHO 細胞ゲノム領域とターゲティングベクター相同領域との境界部を含む約 1.7Kb の特異的増幅が認められるものを陽性クローンと判定した。

(3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

- 5 本項(2)で陽性が確認されたクローンに対し、ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断を以下の様にして行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 10 分間静置後、陽性クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。600 μg/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (グライナー社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 200 μg/mL RNase A] 150 μL に一晩溶解した。

- 15 上記で調製したゲノム DNA 12 μg を 25 単位の制限酵素 BamHI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA] 20 μL に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行った。

- 一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、W002/31140 の実施例 12 に記載の方法により取得した FUT8 ゲノム領域 (配列番号 9) のうち、ターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 14 および配列番号 15) を用いて、以下の PCR を行った。即ち、W002/31140 の実施例 12 に記載の方法により構築したプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20 μL の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μmol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 14 および配列番号 15)] を調製し、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。
- 30 PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5 μL に対し、[α-<sup>32</sup>P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

- ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100 μg/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65℃で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mL に浸漬し、65℃で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mL



に浸漬し、65℃で15分間加温した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

親株であるCHO/DG44細胞、および本項(2)で取得した陽性クローンである50-10-104株のゲノムDNAを本法により解析した。CHO/DG44細胞では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片のみが検出された。一方、陽性クローン50-10-104株では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約20.0Kbの断片が検出された。両断片の量比は1:1であったことから、50-10-104株は、FUT8対立遺伝子のうち1コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

### 3. ゲノム上のFUT8遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞の作製

#### (1) ターゲティングベクターpKOFUT8Puro導入株の取得

実施例1の2項(2)で得たFUT8ヘミノックアウトクローン50-10-104に対し、W002/31140の実施例13の1項に記載の方法により構築したチャニーズハムスターFUT8遺伝子エクソン2ターゲティングベクタープラスミドpKOFUT8Puroを以下の様にして導入した。

プラスミドpKOFUT8Puro 440 $\mu$ gを800単位の制限酵素SalI(New England Biolabs社製)を加えて37℃で5時間反応させて直線状化した後、4 $\mu$ gを $1.6 \times 10^6$ 細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)]により導入後、IMDM-dFBS(10)-HT(1)に懸濁し、接着細胞培養用10cmデッシュ(Falcon社製)へ播種した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養後、ピューロマイシン(SIGMA社製)を15 $\mu$ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)-HT(1)10mLに培地交換した。

この培地交換作業を7日毎に繰り返しながら15日間の培養を行い、薬剤耐性クローンを取得した。

#### (2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(1)で得た薬剤耐性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断を行った。

ピューロマイシン耐性クローンが出現した10cmデッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液7mLを注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン(GILSON社製)を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底96穴プレート(Falcon社製)へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底96穴プレート(旭テクノグラス社製)へ各クローンを播種し、ピューロマイシン(SIGMA社製)を15 $\mu$ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)-HT(1))を用いて1週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底24穴プレート(Greiner社製)へ播種した。ピューロマイシン(SIGMA社製)を15 $\mu$ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)-HT(1))を用いて1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート(Greiner社製)へ播種した。該プレートより公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々TE-RNase緩衝液(pH8.0)150 $\mu$ Lに一晩溶解した。

上記で調製したゲノムDNA12 $\mu$ gを25単位の制限酵素BamHI(New England Biolabs社製)を加えて37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収

した後、TE 緩衝液 (pH8.0) 20  $\mu$ L に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80°C で 2 時間の熱処理を行った。

5 一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 16 および配列番号 17) を用いて、以下の PCR を行った。即ち、W002/31140 の実施例 12 に記載の方法により構築したプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 16 および配列番号 17)] を調製し、94°C で 1 分間の加熱の後、94°C  
10 で 30 秒間、55°C で 30 秒間、74°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 後、反応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5  $\mu$ L に対し、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用い  
15 て放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5×SSPE、50×Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65°C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、<sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。  
20

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mL に浸漬し、65°C で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2×SSC-0.1% (w/v) SDS 50mL に浸漬し、65°C で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80°C で暴露し現像した。

25 50-10-104 株から本項 (1) に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの 1 つである WK704 株のゲノム DNA を本法により解析した。WK704 株では、野生型 FUT8 対立遺伝子由来の約 25.5Kb の断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約 20.0Kb の断片のみが検出された。この結果から WK704 株は、FUT8 両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

#### 30 4. FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

##### (1) Cre リコンビナーゼ発現ベクターの導入

実施例 1 の 3 項で作製した FUT8 ダブルノックアウトクローンのうち WK704 に対し、Cre リコンビナーゼ発現ベクター pBS185 (Life Technologies 社製) を以下の様にして導入した。

35 プラスミド pBS185 4  $\mu$ g を  $1.6 \times 10^6$  細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT (1) 10mL に懸濁し、さらに同培地を用いて 2 万倍希釈した。該希釈液を接着細胞培養用 10cm ディッシュ (Falcon 社製) 7 枚へ播種後、5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で 10 日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

##### (2) Cre リコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

WK704 に対し遺伝子導入して得たコロニーより任意のクローンを以下の手順で採取した。まず、10cm ディッシュより培養上清を除去し、リン酸緩衝液 7mL を注入した後、実体顕微鏡下に移した。次にピペットマン (GILSON 社製) を用いてコロニーを掻き取って吸い込み、丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) へ採取した。トリプシン処理を行った後、接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ各クローンを播種し、IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて 1 週間培養した。

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、2 倍量の凍結培地[20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] と混和した。このうち半量を接着細胞用平底 96 穴プレート (岩城硝子社製) へ播種してレプリカプレートを作製する一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存に供した。

次にレプリカプレートを、G418 を 600  $\mu$ g/mL、ピューロマイシンを 15  $\mu$ g/mL の濃度で含む IMDM-dFBS (10)-HT(1) を用いて 7 日間培養した。Cre リコンビナーゼの発現により loxP 配列に挟まれた両対立遺伝子上の薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418 およびピューロマイシン存在下で死滅する。本ネガティブ選択法により陽性クローンを選択した。

### (3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で見出された陽性クローン (4-5-C3) に対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む 96 穴プレートを選択し、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 10 分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底 24 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。10% ウシ胎児血清

(Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) を用いて 1 週間培養した後、接着細胞用平底 6 穴プレート (Greiner 社製) へ播種した。該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノム DNA を調製し、各々 TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) 150  $\mu$ L に一晩溶解した。

上記で調製したゲノム DNA 12  $\mu$ g を 20 単位の制限酵素 NheI (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で一晩消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収した後、TE 緩衝液 (pH8.0) 20  $\mu$ L に溶解し、0.6% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従い、ナイロン膜へゲノム DNA を転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し 80℃で 2 時間の熱処理を行い、固定化した。

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、FUT8 ゲノム領域のうちターゲティングベクター相同領域を越えた部分の配列に結合するプライマー (配列番号 16 および配列番号 17) を用いて、以下の PCR を行った。即ち、実施例 1 の 1 項(2)で得たプラスミド pFUT8fgE2-2 4.0ng を含む 20  $\mu$ L の反応液 [DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製)、ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 16 および配列番号 17)] を調製し、94℃で 1 分間の加熱の後、94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、74℃で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとした 25 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 後、反

応液を 1.75% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、約 230bp のプローブ DNA 断片を精製した。得られたプローブ DNA 溶液 5  $\mu$ L に対し、[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP 1.75MBq および Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液 [5 $\times$ SSPE、50 $\times$ Denhardt's 液、0.5% (w/v) SDS、100  $\mu$ g/mL サケ精子 DNA] 15mL を加えて 65 $^{\circ}$ C で 3 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、 $^{32}$ P 標識したプローブ DNA を熱変性してボトルへ投入し、65 $^{\circ}$ C で一晩加温した。

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 2 $\times$ SSC-0.1% (W/V) SDS 50mL に浸漬し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。上記の洗浄操作を 2 回繰り返した後、膜を 0.2 $\times$ SSC-0.1% (W/V) SDS 50mL に浸漬し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間加温した。洗浄後、ナイロン膜を X 線フィルムへ -80 $^{\circ}$ C で暴露し現像した。

前述の制限酵素 NheI 処理により、野生型 FUT8 対立遺伝子から約 8.0Kb の DNA 断片が生じる。また、同制限酵素処理により、ターゲティングベクターとの相同組換えが起こった対立遺伝子から約 9.5Kb の DNA 断片が生じた。さらに、相同組換えが起こった対立遺伝子からネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) またはピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去された場合には、同処理により約 8.0Kb の DNA 断片が生じた。

親株である CHO/DG44 細胞、本実施例の 2 項に記載の 50-10-104 株、本実施例の 3 項に記載の WK704 株、および WK704 株から本項 (2) に記載の方法により取得した薬剤感受性クローンの 1 つである 4-5-C3 株のゲノム DNA を、本法により解析した。CHO/DG44 細胞では、野生型 FUT8 対立遺伝子に由来する約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。また、50-10-104 株や WK704 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約 9.5Kb の DNA 断片が認められた。一方、4-5-C3 株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子 (約 1.6Kb) およびピューロマイシン耐性遺伝子 (約 1.5Kb) が除去されて生じる約 8.0Kb の DNA 断片のみが検出された。この結果から 4-5-C3 株は、Cre リコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去された FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン (以下、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する) は、4-5-C3 株以外にも複数株取得された。

## 実施例 2 FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞における抗体分子の発現

### 1. 抗 CD20 キメラ抗体発現ベクターの作製

#### (1) 抗 CD20 マウスモノクローナル抗体の VL をコードする cDNA の構築

W094/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の VL のアミノ酸配列をコードする cDNA (配列番号 18) を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、W094/11026 記載の VL の塩基配列の 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、

アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 20、21、22、23、24、および 25 の 6 本の合成 DNA を作製 (GENSET 社製へ委託) した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  となる様に、 $50 \mu\text{L}$  の反応液 [KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、 $0.2 \text{mM}$  dNTPs、 $1 \text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer M4 (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer RV (宝酒造社製)] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$  にて 3 分間加熱した後、2.5 5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、 $94^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  にて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行ない、更に  $72^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応させた。該反応液  $25 \mu\text{L}$  をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約  $0.44 \text{kb}$  の VL の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 Sma I (宝酒造社製) して得られた DNA  $0.1 \mu\text{g}$  と、上記で得られた PCR 産物約  $0.1 \mu\text{g}$  を滅菌水に加えて  $7.5 \mu\text{L}$  とし、TAKARA ligation kit ver. 2 の solution I (宝酒造社製)  $7.5 \mu\text{L}$ 、制限酵素 Sma I (宝酒造社製)  $0.3 \mu\text{L}$  を加えて  $22^\circ\text{C}$  で 2 時間反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 15 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する図 2 に示したプラスミド pBS-2B8L を得た。

## 20 (2) 抗 CD20 マウスモノクローナル抗体の VH をコードする cDNA の構築

W094/11026 に記載されている抗 CD20 マウスモノクローナル抗体 2B8 の VH のアミノ酸配列をコードする cDNA (配列番号 19) を PCR 法を用いて以下の様にして構築した。

まず、W094/11026 記載の VH の塩基配列の 5' 末端と 3' 末端に PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列 (ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列も含む) を付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 100 塩基ずつ計 6 本の塩基配列に分け (隣 25 り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有する様にする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順で、実際には、配列番号 26、27、28、29、30、および 31 の 6 本の合成 DNA を作製 (GENSET 社製へ委託) した。

各オリゴヌクレオチドを最終濃度が  $0.1 \mu\text{M}$  となる様に、 $50 \mu\text{L}$  の反応液 [KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、 $0.2 \text{mM}$  dNTPs、 $1 \text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer M4 (宝酒造社製)、 $0.5 \mu\text{M}$  M13 primer RV (宝酒造社製)] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$  にて 3 分間加熱した後、2.5 30 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、 $94^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $55^\circ\text{C}$  にて 30 秒間、 $74^\circ\text{C}$  にて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行ない、更に  $72^\circ\text{C}$  にて 10 分間反応させた。該反応液  $25 \mu\text{L}$  をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約  $0.49 \text{kb}$  の VH の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 Sma I (宝酒造社製) して得られた DNA  $0.1 \mu\text{g}$  と、上記で得られた PCR 産物約  $0.1 \mu\text{g}$  を滅菌水に加えて  $7.5 \mu\text{L}$  とし、

TAKARA ligation kit ver.2 の solution I (宝酒造社製) 7.5  $\mu$ L、制限酵素 Sma I (宝酒造社製) 0.3  $\mu$ L を加えて 22°C で一晩反応させた。

この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator  
5 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する図 3 に示したプラスミド pBS-2B8H を得た。

次に、14 番目のアミノ酸残基を Ala から Pro へ置換するために、配列番号 32 で示した合成 DNA を設計し、LA PCR in vitro Mutagenesis Primer Set for pBluescriptII (宝酒造社製)  
10 を用いた PCR 法により、以下の様に塩基の置換を行った。上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50  $\mu$ L の反応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)、50nM 上記の変異導入用プライマー (配列番号 32、GENSET 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp  
15 PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、94°C にて 30 秒間、55°C にて 2 分間、72°C にて 1 分 30 秒間のサイクルを 25 サイクル行なった。該反応液 30  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.44kb の PCR 産物を回収し、30  $\mu$ L の水溶液とした。また、同様に、上記のプラスミド pBS-2B8H を 1ng 含む 50  $\mu$ L の反  
20 応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、2.5 単位の TaKaRa LA Taq、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム、50nM T7 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製)、50nM MUT B1 primer (宝酒造社製)] の PCR 反応を行った。該反応液 30  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel  
Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.63kb の PCR 産物を回収し、30  $\mu$ L の水溶液とした。続いて、上記で得られた 0.44kb の PCR 産物と 0.63kb の PCR 産物を 0.5  $\mu$ L ずつ 47.5  $\mu$ L  
25 の反応液 [LA PCR Buffer II (宝酒造社製)、0.4mM dNTPs、2.5mM 塩化マグネシウム] に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer 社製) を用いて、90°C にて  
10 分間加熱した後、60 分間かけて 37°C まで冷却した後、37°C で 15 分間保持することによって DNA をアニーリングさせた。2.5 単位の TaKaRa LA Taq (宝酒造社製) を添加して 72°C にて 3  
分間反応させた後、10pmol ずつの T3 BcaBEST Sequencing primer (宝酒造社製) と T7 BcaBEST  
Sequencing primer (宝酒造社製) を添加して反応液を 50  $\mu$ L とし、94°C にて 30 秒間、55°C にて 2 分間、72°C にて 1 分 30 秒間のサイクルを 10 サイクル行なった。該反応液 25  $\mu$ L を QIA quick  
30 PCR purification kit (QIAGEN 社製) にて精製した後、半量を 10 単位の制限酵素 KpnI (宝酒造社製) と 10 単位の制限酵素 SacI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.59kb の KpnI-SacI 断片を回収した。

次に、pBluescriptII SK(-) (Stratagene 社製) 1  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 KpnI (宝酒造社製) と 10 単位の SacI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、該反応液をアガロ  
35 ースゲル電気泳動にて分画し、約 2.9kb の KpnI-SacI 断片を回収した。

上記で得られた PCR 産物由来の KpnI-SacI 断片とプラスミド pBluescriptII SK(-) 由来の KpnI-SacI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株

(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製)を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。

5 こうして目的の塩基配列を有する図 3 に示したプラスミド pBS-2B8Hm を得た。

(3) 抗 CD20 ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035, 2000) と本項 (1) および (2) で得られたプラスミド pBS-2B8L および pBS-2B8Hm を用いて抗 CD20 ヒト型キメラ抗体 (以下、抗 CD20 キメラ抗体と表記する) の発現ベクター pKANTEX2B8P を以下の様にして構築した。

10 本項 (1) で得られたプラスミド pBS-2B8L の 2  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて 55°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.41kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

15 次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の 2  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて 55°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75kb の BsiWI-EcoRI 断片を回収した。

20 次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8L 由来 BsiWI-EcoRI 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の BsiWI-EcoRI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、図 4 に示したプラスミド pKANTEX2B8-L を得た。

25 次に、本項 (2) で得られたプラスミド pBS-2B8Hm の 2  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.45kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX2B8-L の 3  $\mu$ g を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた後、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を用いて 37°C で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.16kb の ApaI-NotI 断片を回収した。

30 次に、上記で得られたプラスミド pBS-2B8Hm 由来の ApaI-NotI 断片とプラスミド pKANTEX2B8-L 由来の ApaI-NotI 断片を DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) の Solution I を用いて、添付の説明書に従って連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製した。

35 得られたプラスミドを用い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems 社製) を同社の DNA シークエンサー 377 を用いて塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされている図 4 に示したプラスミド pKANTEX2B8P が得られたことを確認した。



## 2. 抗 CD20 キメラ抗体の発現

実施例 1 第 5 項の(2)で作製した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704 に対し、本実施例第 1 項で得た抗 CD20 抗体発現ベクター pKANTEX2B8P を導入した。

プラスミド pKANTEX2B8P の WK704 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKANTEX2B8P 10  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 100  $\mu$ l に溶解し、40 単位の制限酵素 AatII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 水溶液とした。一方、WK704 を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.0mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ] に懸濁して  $8 \times 10^7$  個/ml とした。細胞懸濁液 200  $\mu$ l ( $1.6 \times 10^6$  個) を上記線状化プラスミド 4  $\mu$ l (4  $\mu$ g) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250  $\mu$ F の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) へ播種した。5%  $\text{CO}_2$ 、37°C の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) 10ml を注入した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、形質転換株 WK704-2B8P を取得した。なお、WK704-2B8P 株は WK704-2B8P の株名で、平成 15 年 3 月 20 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に FERM BP-8337 として寄託されている。

## 3. 抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体の発現

実施例 1 第 5 項の(2)で作製した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704 に対し、抗ガングリオシド GD3 キメラ抗体発現ベクタープラスミド pKANTEX641 を導入し、抗 GD3 キメラ抗体の安定的発現株を作製した。pKANTEX641 は、W000/61739 記載の抗 GD3 キメラ抗体発現ベクタープラスミド pChi641LHGM4 およびヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 [モレキュラー・イムノロジー (Mol. Immunol.), 37, 1035 (2000)] より構成された誘導体であり、pChi641LHGM4 より得たタンデム型抗体発現ユニットを含む EcoRI-HindIII 断片を pKANTEX93 より得た複製起点を含む EcoRI-HindIII 断片へ連結したものである。

プラスミド pKANTEX641 の WK704 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKANTEX641 10  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 100  $\mu$ l に溶解し、40 単位の制限酵素 AatII (New England Biolabs 社製) を加えて 37°C で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 水溶液とした。一方、WK704 を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、4.0mmol/l  $\text{MgCl}_2$ ] に懸濁して  $8 \times 10^7$  個/ml とした。細胞懸濁液 200  $\mu$ l ( $1.6 \times 10^6$  個) を上記線状化プラスミド 4  $\mu$ l (4  $\mu$ g) と混和

した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250  $\mu$ F の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) へ播種した。5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) 10ml を注入した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、形質転換株 WK704-2871 を取得した。なお、WK704-2871 株は WK704-2871 の株名で、平成 15 年 3 月 20 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に FERM BP-8336 として寄託されている。

#### 4. 抗 CCR4 キメラ抗体の発現

実施例 1 第 5 項の (2) で作製した FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704 に対し、W001/64754 記載の抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 を導入し、抗 CCR4 キメラ抗体の安定的発現株を作製した。

プラスミド pKANTEX2B8P の WK704 への遺伝子導入はエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミド pKANTEX2160 15  $\mu$ g を NEBuffer 4 (New England Biolabs 社製) 100  $\mu$ l に溶解し、40 単位の制限酵素 AatII (New England Biolabs 社製) を加えて 37℃で 2 時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿を行い、回収した線状化プラスミドを 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 水溶液とした。一方、WK704 を K-PBS 緩衝液 [137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.0mmol/l MgCl<sub>2</sub>] に懸濁して 8 $\times$ 10<sup>7</sup> 個/ml とした。細胞懸濁液 200  $\mu$ l (1.6 $\times$ 10<sup>6</sup> 個) を上記線状化プラスミド 4  $\mu$ l (4  $\mu$ g) と混和した後、細胞-DNA 混和液の全量を Gene Pulser Cuvette (電極間距離 2mm) (BIO-RAD 社製) へ移し、細胞融合装置 Gene Pulser (BIO-RAD 社製) を用いてパルス電圧 350V、電気容量 250  $\mu$ F の条件で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、細胞懸濁液を 10% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) に懸濁し、接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) へ播種した。5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で 24 時間培養した後、培養上清を除去し、10% ウシ胎児透析血清 (Invitrogen 社製) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen 社製) 10ml を注入した。この培地交換作業を 3~4 日毎に繰り返しながら 15 日間の培養を行い、形質転換株 WK704-2760 を取得した。なお、WK704-2760 株は WK704-2760 の株名で、平成 15 年 3 月 20 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に FERM BP-8335 として寄託されている。

#### 5. 培養上清中のヒト IgG 抗体濃度の測定 (ELISA 法)

ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体 (American Qualex 社製) を Phosphate Buffered Saline (以下、PBS と表記する) (インビトロジェン社製) で希釈して 1  $\mu$ g/ml とし、96 穴の ELISA 用プレート (グラインナー社製) に、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、BSA

を1%の濃度で含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）（和光純薬社製）を100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清、または培養上清から精製した抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween20を0.05%の濃度で含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）（和光純薬社製）で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBSで2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、それぞれ50 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム（和光純薬社製）の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素（和光純薬社製）を1 $\mu$ L/mLで添加した溶液]を50 $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度（以下、OD415と表記する）を測定した。

#### 6. 抗体分子の精製

本実施例第2項で得た抗CD20抗体発現株WK704-2B8Pを、10%ウシ胎児透析血清（Invitrogen社製）を添加したIMDM培地（Invitrogen社製）へ $3 \times 10^5$ 個/mLの密度で懸濁後、接着細胞培養用T182フラスコ（Greiner社製）10本へ計300mL播種した。同様に、本実施例第3項で得た抗GD3抗体発現株WK704-2871および本実施例第4項で得た抗CCR4抗体発現株WK704-2760を播種した。3日間の培養後、各株の上清全量を除去し、EXCELL301培地（JRHBiosciences社製）へ交換した。これらを37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で7日間培養後、各細胞懸濁液を回収した。回収した各細胞懸濁液に対し3000rpm、4℃の条件で10分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22 $\mu$ m孔径500mL容PES Membrane（旭テクノグラス社製）を用いて濾過した。

0.8cm径のカラムにMab Select（Amersham Pharmacia Biotech社製）0.5mLを充填し、精製水3.0mLおよび0.2mol/Lホウ酸-0.15mol/L NaCl緩衝液（pH7.5）3.0mLを順次通筒した。さらに、0.1mol/Lクエン酸緩衝液（pH3.5）2.0mLおよび0.2mol/Lホウ酸-0.15mol/L NaCl緩衝液（pH7.5）1.5mLで順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清300mLをカラムに通筒した後、0.2mol/Lホウ酸-0.15mol/L NaCl緩衝液（pH7.5）3.0mLで洗浄した。洗浄後、0.1mol/Lクエン酸緩衝液（pH3.5）1.25mLを用いて担体に吸着した抗体の溶出を行った。初めに溶出する250 $\mu$ Lの画分を廃棄し、次に得られる溶出画分1mLを回収して2mol/L Tris-HCl（pH8.5）200 $\mu$ Lと混合して中和した。取得した溶出液に対し、10mol/Lクエン酸-0.15mol/L NaCl緩衝液（pH6.0）を用いて4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22 $\mu$ m孔径Millex GV（MILLIPORE社製）を用いて滅菌濾過した。

#### 実施例3 FUT8遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞が産生する抗体組成物の in vitro 細胞障害活性（ADCC活性）

実施例2第6項で精製した抗CD20抗体の in vitro 細胞障害活性を評価するため、以下の記述に従いADCC活性を測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS (10) 培地 (FCS を 10% 含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製)) で培養したヒト B リンパ球培養細胞株 Raji 細胞 (JCRB9012) を遠心分離操作および懸濁により RPMI1640-FCS (5) 培地 (FCS を 5% 含む RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社製)) で洗浄した後、RPMI1640-FCS (5) 培地によって、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

#### 5 (2) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (AXIS SHIELD 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離 (800g、20 分間) して単核球層を分離した。RPMI1640-FCS (5) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて  $4 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

#### 10 (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の 50  $\mu$ L ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで上記 (2) で調製したエフェクター細胞溶液を 50  $\mu$ L ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CD20 キメラ抗体を各最終濃度 0.3~3000ng/mL となるように加えて全量を 150  $\mu$ L とし、  
 15 37°C で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 社製) を用いて測定した。標的細胞自然遊離 LDH 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の  
 20 操作を行うことで取得した。全標的細胞破壊にともなう全遊離 LDH 量は、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了 45 分前に 15  $\mu$ L の 9% Triton X-100 溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の LDH 活性を測定することにより求めた。これらの値を用いて下式 (II) により、ADCC 活性を求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{(\text{検体上清中の LDH 量}) - (\text{自然遊離 LDH 量})}{(\text{全遊離 LDH 量}) - (\text{自然遊離 LDH 量})} \times 100 \quad (\text{II})$$

25 図 5 に各抗 CD20 抗体の ADCC 活性を示した。FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704-2B8P より得た抗体は、いずれの抗体濃度においても市販 Rituxan™ より高い ADCC 活性を示し、最高細胞障害活性値も高かった。Rituxan™ は、FUT8 遺伝子が破壊されていない CHO 細胞を宿主細胞として製造された抗 CD20 キメラ抗体である。また、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローン WK704-2871 株、WK704-2760 株より得たそれぞれの抗体に関して ADCC 活性を測定したところ、抗 CD20 抗体の場合と同様に、FUT8 遺伝子が破壊されていない通常の CHO 細胞株が産生する抗体に比べて高い細胞障害活性を示した。以上の結果より、FUT8 対立遺伝子を破壊した宿主細胞を用いることにより、FUT8 遺伝子が破壊されていない宿主細胞を用いた場合より、細胞障害活性の高い抗体の生産が可能となることが分かった。

#### 35 実施例 4

FUT8 対立遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞が産生する抗体組成物の単糖組成分析

実施例 2 第 6 項で取得した、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンが生産した抗 CD20 抗体、抗 GD3 抗体および抗 CCR4 抗体の中性糖・アミノ糖組成分析を、以下の様にして行った。

- 5 抗体を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0-4.0mol/L のトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100℃、2-4 時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解して Dionex 社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析を行った。CarboPac PA-1 カラム、CarboPac PA-1 ガードカラム (Dionex 社製) を用い、溶離液として 10-20mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として 500mM 水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、以下の溶出プログラムで分析した。

表 1

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

得られた中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を 4 とした場合の各成分 (フコース、ガラクトース、マンノース) の組成比を算出した。

- 15 各抗体の単糖組成比をもとに、全複合型糖鎖に占めるフコースを持たない複合型糖鎖の割合を計算した結果、FUT8 遺伝子ダブルノックアウトクローンが生産した抗 CD20 抗体、抗 GD3 抗体および抗 CCR4 抗体の複合型糖鎖には、フコースが結合していないことが示された。

実施例 5 FUT8 遺伝子をダブルノックアウトした CHO/DG44 細胞の無蛋白培地への馴化

- 20 実施例 1 で作製した FUT8 ダブルノックアウト CHO/DG44 細胞である 4-5-C3 株の無蛋白培地への馴化を行った。

- IMDM 培地 (インビトロジェン社製) に 1% (v/v) HT サプリメント (インビトロジェン社製) 及び 10% (v/v) 牛胎児血清 (dFBS; インビトロジェン社製) を含有してなる血清添加培地 (以下、「基本血清培地」という) を作製した。該培地を用い 4-5-C3 株を  $2 \sim 4 \times 10^5$  細胞/mL の細胞密度で T 型フラスコに接種し、継代期間を 2~4 日間として、37℃で 5% CO<sub>2</sub> 濃度で静置培養を行った。継代時には、遠心分離により培養液から新鮮培地への全量交換を実施した。

- 上記継代培養で得られた細胞を用い、EX-CELL325PF (JRH 社製) に 1% (v/v) HT サプリメント (インビトロジェン社製) 及び 6mM グルタミン (インビトロジェン社製) を含有してなる無蛋白培地 (以下、「基本無蛋白培地」という) により 6 継代 29 日間の静置継代培養を行った。培養は、血清培養時と同様、T 型フラスコを用い 37℃で 5% CO<sub>2</sub> 濃度の条件で行った。引き続き基

本無蛋白培地にて、三角フラスコを用いた浮遊旋回培養を 6 継代 20 日間行った。培養温度は 35℃、旋回速度は 90~100rpm とし、継代の際には、培養容器の 4 倍量以上の 5% 濃度 CO<sub>2</sub> を培地上面に通気し、三角フラスコ中の空気を置換して継代した。

5 上述の基本無蛋白培地を用いた継代培養により、培養初期には細胞凝集し増殖しなかった細胞を、最終的には基本無蛋白培地で継代可能な馴化細胞に変換することができた。

次に、取得した無蛋白培地に馴化させた 4-5-C3 株を、限界希釈法により、以下のようにクローニングした。

10 基本無蛋白培地を用いて取得した馴化細胞を希釈し、96 ウエルプレートに 0.5 細胞/ウエルで、1 ウエルあたり 0.05mL ずつ接種した。続いて、滅菌フィルターを用いて滅菌処理を施した馴化細胞株の培養上清（コンディションメディウム）を 1 ウエルあたり 0.05mL ずつ加えた。合計 768 ウエルに播種し 1~2 週間培養した結果、単一のコロニー増殖を確認した 49 クローンを得た。取得した 49 クローンを 24 ウエルプレート、6 ウエルプレートへと拡大培養し、取得した個々のクローン増殖性を考慮し、増殖性の良い 17 クローンを選択した。選択された 17 クローンを混合し、無蛋白培地馴化細胞とした。

15 得られた無蛋白培地馴化細胞を無蛋白培地で継代した際の、生細胞密度、生存率の推移を示した。結果を図 6 に示す。

20 図 6 に示される通り、上記方法で得られた無蛋白培地馴化細胞は、低い細胞密度で培地に培養した後、2~3 日間で 3 倍の細胞量に増殖している。このことは、親株である無蛋白培地馴化前の細胞株とは異なり、基本無蛋白培地を用いて培養しても安定して継代培養を行うことができるように変換されていることを示している。

#### 実施例 6 無蛋白培地に馴化した、FUT8 遺伝子ダブルノックアウト CHO/DG44 細胞の無血清フェドバッチ培養

実施例 5 で取得した無蛋白培地馴化細胞を用いて、フェドバッチ培養を行った。

25 基本無蛋白培地を用いて  $2 \times 10^5$  細胞/mL の細胞密度に無蛋白培地馴化細胞を調製した。125mL の三角フラスコに調製した無蛋白培地馴化細胞を 15mL 加え、培養温度 35℃、旋回速度 100rpm で 3 日間培養した。なお、細胞播種の際には、500mL 以上の 5% 濃度 CO<sub>2</sub> を培地上面に通気し、三角フラスコ中の空気を置換した。3 日間の培養で得られた細胞を種細胞として、基本無蛋白培地を用いて  $3 \times 10^5$  細胞/mL の細胞密度に調製後、125mL の三角フラスコに 30mL 播種し、培養  
30 温度 35℃ 旋回速度 100rpm でフェドバッチ培養を開始した。細胞を播種する際には、1L 以上の 5% 濃度 CO<sub>2</sub> を培地上面に通気することでフラスコ内の空気を置換した。フェドバッチ培養開始後、アミノ酸などの消費量を補う目的で培養 3 日目、6 日目に 3.3mL ずつ以下に示す組成のフィード培地を添加した。また、培養 3 日目に、グルコースの終濃度が 5000mg/L となるよう、20% (w/v) グルコース溶液を添加した。その結果を図 7 に示す。細胞は培養開始  
35 から 3 日目後まで増殖し、3~6 日目まではその細胞密度がほぼ維持された。培養 6 日目の生細胞密度は  $2 \times 10^6$  細胞/mL まで達した。培養開始から 6 日を過ぎると生存率が急速に低下し、9 日目には細胞生存率が 50% を切り、フェドバッチ培養を終了した。

なお、フェドバッチ培養に用いたフィード培地は、通常の培地にアミノ酸（L-アラニン0.177 g/L、L-アルギニン塩酸0.593 g/L、L-アスパラギン水和物0.177 g/L、L-アスパラギン酸0.212 g/L、L-シスチン二塩酸0.646 g/L、L-グルタミン酸0.530 g/L、L-グルタミン5.84 g/L、グリシン0.212 g/L、L-ヒスチジン塩酸二水和物0.297 g/L、L-イソロイシン0.742 g/L、L-ロイシン0.742 g/L、L-リジン塩酸1.031 g/L、L-メチオニン0.212 g/L、L-フェニルアラニン0.466 g/L、L-プロリン0.283 g/L、L-セリン0.297 g/L、L-スレオニン0.671 g/L、L-トリプトファン0.113 g/L、L-チロシン二ナトリウム二水和物0.735 g/L、L-バリン0.664 g/L）、  
5 ビタミン（d-ビオチン0.0918 mg/L、D-パントテン酸カルシウム0.0283 g/L、塩化コリン0.0283 g/L、葉酸0.0283 g/L、myo-イノシトール0.0509 g/L、ナイアシンアミド0.0283 g/L、ピリドキサル塩酸0.0283 g/L、リボフラビン0.00283 g/L、チアミン塩酸0.0283 g/L、シアノコバラミン0.0918 mg/L）、インシュリン0.314 g/Lを添加した培地であった。

15

実施例7 無蛋白培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウトCHO/DG44細胞による抗CD20ヒト型キメラ抗体の製造とその生物活性

実施例6記載の無蛋白培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞を用いて、抗CD20ヒト型キメラ抗体の安定生産細胞を樹立し、抗CD20ヒト型キメラ抗体の生産性ならびに生産された抗体の生物活性を評価した。その際、無蛋白培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞による高ADCC活性抗体製造の優位性を示す目的で、FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞の親株であるCHO/DG44細胞、Stanleyらによって樹立されたCHO細胞のGDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ変異株Lec13細胞（Somat. Cell Mol. Genet. 12, 51（1986））、およびラット-ラットハイブリドーマYB2/0細胞（American Type Culture Collection CRL-1662）からも抗CD20  
20 ヒト型キメラ抗体生産株を樹立して比較を行った。Lec13およびYB2/0細胞では、フコースが結合していない糖鎖の割合が高い高ADCC活性抗体の発現が可能であることが報告されているため比較対照とした（J. Biol. Chem., 277, 30, 26733,（2002）；W002/31140）。

25

#### 1. 抗CD20ヒト型キメラ抗体安定生産株の造成

実施例6記載の無蛋白培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞、CHO/DG44細胞  
30 およびLec13細胞に、実施例2の2項に記載の方法に従って抗CD20ヒト型キメラ抗体発現ベクターpKANTX2B8Pを導入し、96ウェルカルチャープレート（グライナー社製）に播種して5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、1～2週間培養した。IMDM-dFBS(10)培地中で増殖が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体産生量を増加させる目的で、MTX（シグマ社製）を50nmol/L含むIMDM-dFBS(10)培地に交換してさらに1～2週間培養した。  
35 50nmol/LのMTXに耐性を示す形質転換株については、MTX濃度をさらに上昇させて培養を続けた。培養上清中への抗CD20ヒト型キメラ抗体の発現を実施例2の5項に記載のELISA法により測定し、最終的にMTXを200、500または1000nmol/Lの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗CD20ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を選抜した。YB2/0細胞について



は、W003/055993 に記載の方法に従って抗 CD20 ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を選抜した。

次に、このようにして得られた抗 CD20 ヒト型キメラ抗体を高生産する形質転換株を実施例 5 に記載の方法に準じて無血清培地に馴化した。無蛋白培地馴化 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞、CHO/DG44 細胞および Lec13 細胞から樹立した各形質転換株の無血清培地への馴化には、MTX を 200、500 または 1000nmol/L、L-グルタミン（インビトロジェン社製）を 6mM の濃度で含む EX-CELL302 培地（JRH 社製）（以下、無血清培地と表記）を用いた。YB2/0 細胞から樹立した形質転換株の無血清培地への馴化には、CD-Hybridoma 培地（インビトロジェン社製）（以下、無血清培地と表記）を用いた。このようにして無蛋白培地馴化 FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞より樹立した形質転換株を Ms704/CD20 株、CHO/DG44 細胞より樹立した形質転換株を DG44/CD20 株、Lec13 細胞より樹立した形質転換株を Lec13/CD20 株、YB2/0 細胞より樹立した形質転換株を YB/CD20 株と名付けた。なお、Ms704/CD20 株は、平成 16 年 8 月 13 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に FERM BP-10092 として寄託されている。

## 2. 三角フラスコ無血清フェドバッチ培養による抗CD20ヒト型キメラ抗体の製造

本実施例の 1 項で樹立した Ms704/CD20 株、DG44/CD20 株、Lec13/CD20 株および YB/CD20 株を用い、三角フラスコでの無血清フェドバッチ培養を行い、各株による抗 CD20 ヒト型キメラ抗体の製造を行った。

### (1) 三角フラスコでの無血清フェドバッチ培養

フェドバッチ培養の基礎培地には、前項の無血清培地に 20% (w/v) グルコース溶液を終濃度 5000mg/L となるように追添加した培地を使用した（以下、無血清フェドバッチ培養培地と表記）。フィード培地には、各種のアミノ酸（L-アラニン 0.177g/L、L-アルギニン塩酸 0.593g/L、L-アスパラギン水和物 0.177g/L、L-アスパラギン酸 0.212g/L、L-シスチン二塩酸 0.646g/L、L-グルタミン酸 0.530g/L、L-グルタミン 5.84g/L、グリシン 0.212g/L、L-ヒスチジン塩酸二水和物 0.297g/L、L-イソロイシン 0.742g/L、L-ロイシン 0.742g/L、L-リジン塩酸 1.031g/L、L-メチオニン 0.212g/L、L-フェニルアラニン 0.466g/L、L-プロリン 0.283g/L、L-セリン 0.297g/L、L-スレオニン 0.671g/L、L-トリプトファン 0.113g/L、L-チロシン二ナトリウム二水和物 0.735g/L、L-バリン 0.664g/L）、各種のビタミン（d-ビオチン 0.0918mg/L、D-パントテン酸カルシウム 0.0283g/L、塩化コリン 0.0283g/L、葉酸 0.0283g/L、myo-イノシトール 0.0509g/L、ナイアシンアミド 0.0283g/L、ピリドキサル塩酸 0.0283g/L、リボフラビン 0.00283g/L、チアミン塩酸 0.0283g/L、シアノコバラミン 0.0918mg/L）、およびインシュリン 0.314g/L を含有する培地を用いた。

Ms704/CD20 株、DG44/CD20 株、Lec13/CD20 株および YB/CD20 株を、 $3 \times 10^5$  細胞/mL の密度で無血清フェドバッチ培養培地に懸濁し、該細胞懸濁液 40mL を 250mL 三角フラスコ（コーニング社製）に播種した。培養容器の 4 倍量以上の 5% CO<sub>2</sub> ガスを通気してフラスコ内の空気を置換した後に密栓し、回転数 90~100rpm で攪拌しながら 35℃ にて培養を行った。培養開始後 3 日目、6 日目、9 日目、11 日目に、アミノ酸などの消費を補う目的で上記のフィード培地を 3.3mL 添加し、グルコース濃度を制御する目的で 20% (w/v) グルコース溶液を終濃度 5000mg/L となるように添加し

た。また培養開始後0日目、3日目、6日目、9日目、11日目、13日目に培養液約2mLを採取し、トリパンブルー染色法により生細胞密度と細胞生存率を、実施例3の2項に記載のELISA法により各培養上清中に含まれる抗CD20ヒト型キメラ抗体濃度をそれぞれ測定した。

フェドバッチ培養は、それぞれの細胞株の細胞生存率が60%以下となった時点で終了した。

- 5 培養開始後の各時点におけるMs704/CD20株の生細胞密度、細胞生存率はDG44/CD20株と同等以上であった。一方、Lec13/CD20株は、増殖性が遅く最高細胞到達密度も低かった。また、YB/CD20株は最高細胞到達密度に達した後急激に細胞生存率が低下し長期のフェドバッチ培養は困難であった。また、抗体生産量については、いずれの株においても累積生細胞密度に比例して抗体蓄積量が増加し、培養終了時に最高生産量に達した。従って、FUT8遺伝子を破壊した細胞株において、親株に比べて細胞増殖性や培養ストレスによる生存能力に差は見られず、他のフコースが結合していない糖鎖の割合が高い高ADCC活性抗体の発現が可能な株に比べて良い培養挙動を示すことが明らかとなった。

## (2) 無血清フェドバッチ培養において製造された抗体組成物の生物活性の解析

- 15 上記(1)の無血清フェドバッチ培養で、Ms704/CD20株、DG44/CD20株、Lec13/CD20株およびYB/CD20株から経日的に採取した培養液を用い、それぞれの培養液中に含まれる抗CD20ヒト型キメラ抗体組成物のフコースが結合していない糖鎖の割合を解析した。フコースが結合していない糖鎖の割合は、Biotechnology and Bioengineering, 87, 618, (2004)に記載の公知の方法に基づき、可溶性ヒトFc $\gamma$ RIIIa (以下、shFc $\gamma$ RIIIaと表記)に対する結合活性を指標にしたELISA法により測定した。フコースが結合していない糖鎖の割合が既知の標準抗体としては、20 W003/085119の実施例4の5項に記載のKM2760-1 (フコースが結合していない糖鎖の割合: 90%)、およびKM3060 (フコースが結合していない糖鎖の割合: 10%)を用いた。上記(1)で各株から採取した培養液および標準抗体は1%BSA-PBSで希釈し、5 $\mu$ g/mLの抗体溶液に調製し評価サンプルとした。

- 25 測定の結果、DG44/CD20株のサンプルは、いずれもshFc $\gamma$ RIIIaに対する結合活性がほとんど認められず、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体組成物を含むことが判明した。Lec13/CD20株とYB/CD20株のサンプルは、培養初期にはフコースが結合していない糖鎖の割合が高い抗体組成物を含むが、培養期間が長くなるにつれてフコースが結合した糖鎖構造を有する抗体組成物の割合が高くなることが判明した。Lec13/CD20株のフェドバッチ培養終了時のサンプルに含まれる抗CD20ヒト型キメラ抗体のフコースが結合していない糖鎖の割合は、60%以下30 であった。一方、Ms704/CD20株のサンプルは、培養期間を通じて安定してshFc $\gamma$ RIIIaへの強い結合活性を示した。Ms704/CD20株のサンプルに含まれる抗CD20ヒト型キメラ抗体のフコースが結合していない糖鎖の割合を、標準抗体でのELISAの吸光度をもとに算出したところ、培養期間を通じて100%に保たれていると見積もられた。

- 35 以上の結果から、無血清培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞は、三角フラスコを用いた無血清フェドバッチ培養において、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を持つ抗体組成物を安定に生産できることが判明した。

### 3. 浮遊攪拌リアクター無血清フェドバッチ培養によるフコースが結合していない糖鎖を有する抗CD20ヒト型キメラ抗体の製造

本実施例の2項で無血清培地に馴化したMs704/CD20株が、抗体医薬の商業的な生産に用いられる浮遊攪拌リアクター無血清フェドバッチ培養においても、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体の安定製造が可能か否かを検討した。

#### (1) シード細胞の拡大培養

リアクター培養に至るまでの拡大培養を行う培地として、MTXを500nM、L-グルタミンを1.75g/Lの濃度で含むEX-CELL302培地（以下、拡大培養用培地と表記）を用いた。125mL、250mLまたは1000mL容量の三角フラスコ（コーニング社製）に約10～30%量の拡大培養用培地を入れ、 $3 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように細胞懸濁液を播種し、37℃で4日間培養した。リアクター培養の播種に必要な細胞数が得られるまで複数回継代を繰り返した。

#### (2) リアクター培養

リアクター培養の基本培地として、(1)の拡大培養用培地にMTXを500nM、L-グルタミンを1.75g/Lとなるように追添加した培地（以下、リアクター培養用培地と表記）を用いた。

上記の拡大培養により必要な細胞数を獲得したところで、リアクター培養用培地700mLを満たした1Lバイオリアクター（ABLE社製）に $3 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように細胞を播種し、35℃、pH 7.1、DO 50%の条件下で17日間培養した。フィード培地には、アミノ酸（L-アラニン0.14g/L、L-アルギニン塩酸0.47g/L、L-アスパラギン水和物0.16g/L、L-アスパラギン酸0.17g/L、L-シスチン二塩酸0.51g/L、L-グルタミン酸0.42g/L、L-グルタミン7.3g/L、グリシン0.17g/L、L-ヒスチジン塩酸二水和物0.24g/L、L-イソロイシン0.59g/L、L-ロイシン0.59g/L、L-リジン塩酸0.82g/L、L-メチオニン0.17g/L、L-フェニルアラニン0.37g/L、L-プロリン0.22g/L、L-セリン0.24g/L、L-スレオニン0.53g/L、L-トリプトファン0.09g/L、L-チロシン二ナトリウム二水和物0.58g/L、L-バリン0.53g/L）、ビタミン（d-ビオチン0.073mg/L、D-パントテン酸カルシウム0.022g/L、塩化コリン0.022g/L、葉酸0.022g/L、myo-イノシトール0.040g/L、ナイアシンアミド0.022g/L、ピリドキサル塩酸0.022g/L、リボフラビン0.0022g/L、チアミン塩酸0.022g/L、シアノコバラミン0.073mg/L）、リコンビナントヒトインスリン0.31g/L（JRH社製）、エタノールアミン0.025g/L（シグマ-アルドリッチ社製）、2-メルカプトエタノール0.0098g/L（シグマ-アルドリッチ社製）、大豆加水分解物HY-SOY 8g/L（クウェストインターナショナル社製）、亜セレン酸ナトリウム16.8マイクログ/L（シグマ-アルドリッチ社製）、コレステロール脂質濃縮溶液2mL/L（250×水溶液、インビトロジェン社製）、エチレンジアミン四酢酸第二鉄ナトリウム塩0.05g/L（シグマ-アルドリッチ社製）からなる培地を用い、培養3、5、7、9、11日目に初発培地量の8.3%を添加した。また、培養3日目以降のグルコース濃度が約4g/Lとなるように、500g/Lグルコース溶液を適宜添加した。

培養開始から培養終了まで培養液を毎日1回ずつ採取し、生細胞密度（細胞/mL）および細胞生存率を0.4%トリパンブルー溶液（インビトロジェン社製）を用いた色素排除法により、抗体濃度（mg/L）をHPLCによりそれぞれ測定した。

比抗体生産速度を以下の式より算出した。なお累積生細胞密度（細胞/mL×日）は、各測定時点で生細胞密度（細胞/mL）と単位時間（日）の積を計算し、それらを合計した値とした。本実

施例では、生細胞密度を1日1回測定したので、各時点の生細胞密度×1日を合計して累積生細胞密度とした。

比抗体生産速度 (pg/細胞/日) = 抗体濃度 (mg/L) ÷ 累積生細胞密度 (細胞/mL×日)

5

浮遊攪拌リアクター無血清フエドバッチ培養を行った結果を図8に示した。生細胞密度は培養13日目に最大に達した。細胞生存率は培養開始から培養13日目まで90%以上の高い値を維持し、その後は徐々に低下して培養17日目では12%となった。累積生細胞密度は17日間で $5.6 \times 10^7$  細胞/mL×日、培養終了時の抗体濃度は1.7g/Lに達し、比抗体生産速度は30pg/細胞/日を示した。この結果は、標準的な抗体医薬の製造力価である0.5~1.0g/Lを超えるものであった。また、培養開始後5、7、14、17日目に採取した培養液より精製した抗体からN-グリカナーゼFにてアスパラギン結合型糖鎖を遊離した。除蛋白、イオン交換樹脂による脱塩の後、質量分析計にて糖鎖構造を解析した。培養開始後5、7、14、17日目のいずれの時点においてもフコースが結合した糖鎖は検出限界以下であり、フコースが結合していないN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体が安定して製造されていた。

10

15

以上の結果から、無血清培地に馴化した FUT8 遺伝子ダブルノックアウト細胞は、抗体医薬の商業的な生産に用いられる浮遊攪拌リアクターでの無血清フエドバッチ培養においても、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を持つ抗体組成物を安定的に高生産できることを確認した。

20

4. 無血清フエドバッチ培養により製造されたフコースが結合していない抗体組成物の生物活性

本実施例の3項で製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体（以下、Ms704/CD20抗体とも称す）の生物活性を測定し、本製造法で製造した抗体組成物の優位性を確認した。比較対照としては、市販抗体の生産にも用いられているCHO/DG44細胞を用いて製造した本実施例の2項記載の抗CD20ヒト型キメラ抗体（以下、DG44/CD20抗体とも称す）を用いた。

25

(1) 抗CD20ヒト型キメラ抗体のCD20抗原発現細胞株に対する抗原結合活性

W003/055993の実施例2の1項に記載の蛍光抗体法に従って測定した結果、FACS解析によるRaji細胞への抗体染色強度に差は観察されず、本実施例の3項で製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体と、本実施例の2項記載のCHO/DG44細胞を用いて製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体の抗原結合活性に相違は観察されなかった。従って、無血清培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞を用いて製造を行っても、親株であるCHO/DG44細胞で製造した抗体組成物と同等の抗原結合活性を有することを確認した。

30

(2) 抗CD20ヒト型キメラ抗体の *ex vivo* 細胞傷害活性 (ADCC 活性)

本実施例の3項で製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体と、本実施例の2項記載のCHO/DG44細胞を用いて製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体のヒト末梢血中でのADCC活性を、以下の様にして測定した。

35

24ウェル平底プレート（グライナー社製）の各ウェルに、ダルベッコPBS（インビトロジェン社）で希釈したMs704/CD20抗体およびDG44/CD20抗体を、100μL/ウェルずつ分注した。次いで、健康人から採取しヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を加えたヒト末梢血を500μL/ウェ

ルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、一晚培養した。反応後の各ウェルから150 μLずつ反応液を分取し、1%BSA-PBSで洗浄した後に、FITC標識マウス抗CD19モノクローナル抗体（ベックマン・コールター社製）およびPE標識マウス抗CD2モノクローナル抗体（ファージン社製）を加えて室温、暗所で30分間反応させた。FACS Lysing Solution（ベクトン・ディッキンソン社製）で赤血球除去および細胞固定処理を行い、1%BSA-PBSで洗浄後、固定した細胞を500 μLの1%BSA-PBSに懸濁してセルストレーナー（ファルコン社製）で濾過し解析サンプルとして調製した。フローサイトメーターFACS Caliber（ベクトン・ディッキンソン社製）で1サンプルあたり約5,000個のリンパ球画分を測定し、CD2陰性CD19陽性のB細胞の、全細胞に占める比率を求めた。

- 10 図9に結果を示した。Ms704/CD20抗体添加条件では、DG44/CD20抗体添加条件よりもB細胞の割合が低下しており、Ms704/CD20抗体のB細胞に対する高いADCC活性が示された。この結果から、無血清培地に馴化したFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞を用いて製造した抗体組成物は、親株であるCHO/DG44細胞で製造した抗体組成物よりもヒト血漿中において高い細胞傷害活性を有することを確認した。

15 (3) 抗CD20ヒト型キメラ抗体の*in vitro*細胞傷害活性（ADCC活性）

本実施例の3項で製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体と、本実施例の2項記載の親株であるCHO/DG44細胞で製造した抗CD20ヒト型キメラ抗体の*in vitro* ADCC活性を、実施例3に記載の方法に準じ、ヒトCD20抗原を発現するヒトBリンパ球培養細胞株WIL2-S細胞（ATCC CRL-8885）を標的細胞に用いて測定した。

- 20 図10に結果を示した。いずれの抗体濃度においても、Ms704/CD20抗体添加条件では、DG44/CD20抗体添加条件よりもWIL2-S細胞に対する高いADCC活性が示された。

次に、一定量のMs704/CD20抗体にDG44/CD20抗体を添加することで、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体の割合を変化させた抗CD20ヒト型キメラ抗体組成物を調製し、そのADCC活性を測定した。具体的には、3.7ng/mLのMs704/CD20抗体に0~300ng/mLのDG44/CD20抗体を添加した抗CD20ヒト型キメラ抗体組成物を調製した。

- 25 図11に結果を示した。3.7ng/mLのMs704/CD20抗体にさらにMs704/CD20抗体を添加すると、総抗体濃度の増加に伴ってADCC活性の上昇が観察されたが、3.7ng/mLのMs704/CD20抗体にさらにDG44/CD20抗体を添加しても、総抗体濃度が増加するにも関わらず調製した抗体組成物のADCC活性は逆に低下した。このことは、フコースが結合する糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子のADCC活性を阻害することを示している。また、フコースが結合する糖鎖を有する抗体分子とフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子が混合された抗体組成物においても、フコースが結合していない糖鎖を有する抗体の割合が20%以上の抗体組成物では、該割合が20%未満の抗体組成物に比べ顕著に高いADCC活性を示した。

- 30 さらに、1ng/mLのMs704/CD20抗体サンプルと、1ng/mLのMs704/CD20抗体に9倍量の9ng/mLのDG44/CD20抗体を加えた抗体のADCC活性を測定した。

図12に結果を示した。Ms704/CD20抗体のADCC活性はDG44/CD20抗体を加えることで大幅に低下した。また、Ms704/CD20抗体とDG44/CD20抗体の存在比が1対9のまま抗体組成物の抗体濃度を100倍以上に上昇させても、1ng/mLのMs704/CD20抗体サンプルのADCC活性には及ばなかった。

以上のことから、フコースが結合した糖鎖を有する抗体分子が、フコースが結合しない糖鎖を有する抗体分子のADCC活性を阻害していること、従来の抗体組成物では、本発明の抗体組成物と同等のADCC活性を発揮することはできないことが明らかとなった。

なお、本発明の製造法で製造した他の抗体組成物においても同様の結果が得られた。

5

#### 産業上の利用可能性

本発明により、無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞、該細胞を用いた糖蛋白質組成物の製造方法および該製造方法で製造

10

#### 配列表フリーテキスト

配列番号10-人工配列の説明：合成DNA

配列番号11-人工配列の説明：合成DNA

15

配列番号12-人工配列の説明：合成DNA

配列番号13-人工配列の説明：合成DNA

配列番号14-人工配列の説明：合成DNA

配列番号15-人工配列の説明：合成DNA

配列番号16-人工配列の説明：合成DNA

20

配列番号17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号20-人工配列の説明：合成DNA

配列番号21-人工配列の説明：合成DNA

配列番号22-人工配列の説明：合成DNA

配列番号23-人工配列の説明：合成DNA

25

配列番号24-人工配列の説明：合成DNA

配列番号25-人工配列の説明：合成DNA

配列番号26-人工配列の説明：合成DNA

配列番号27-人工配列の説明：合成DNA

配列番号28-人工配列の説明：合成DNA

30

配列番号29-人工配列の説明：合成DNA

配列番号30-人工配列の説明：合成DNA

配列番号31-人工配列の説明：合成DNA

配列番号32-人工配列の説明：合成DNA

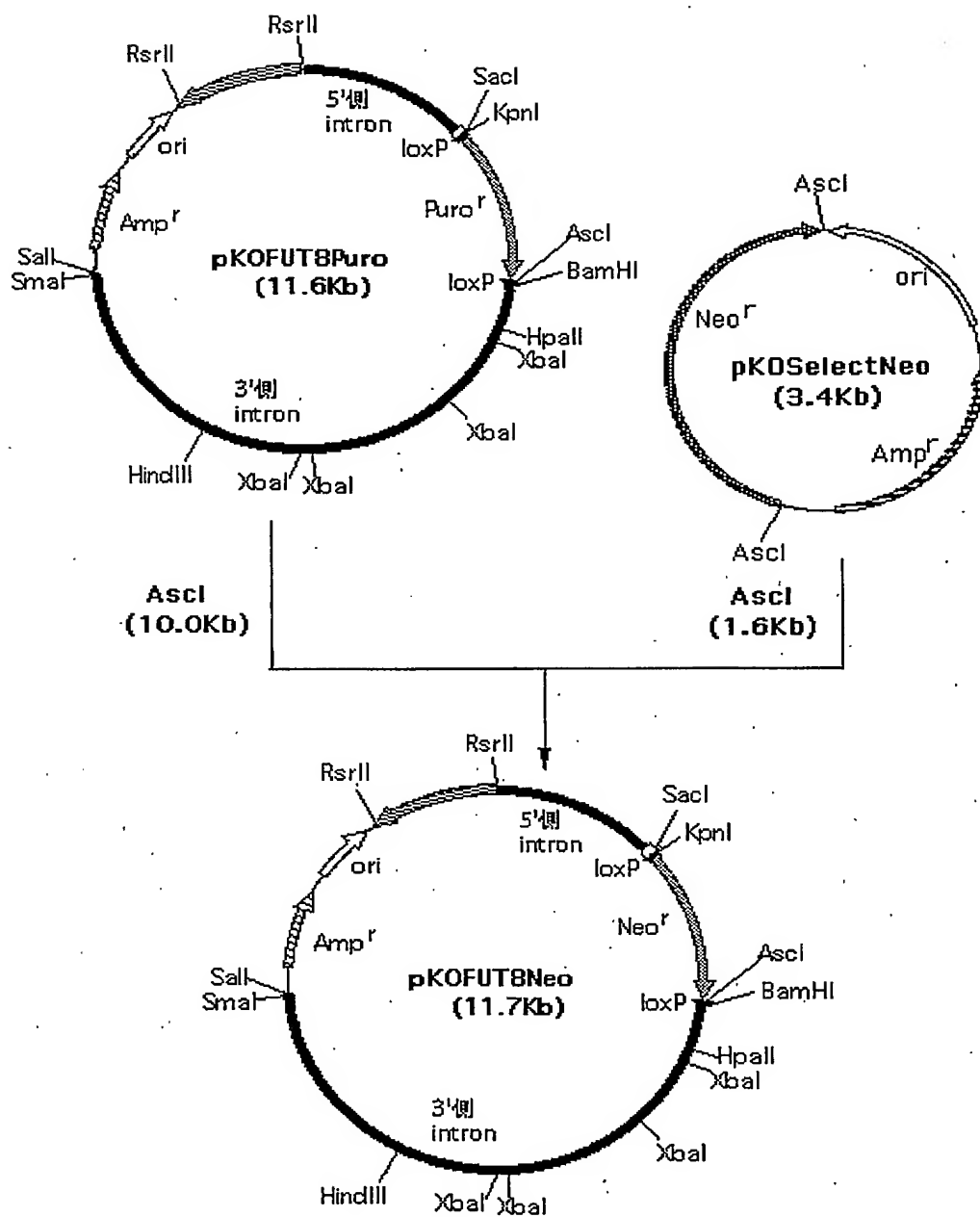
## 請 求 の 範 囲

1. 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞。
2. 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた、請求項1に記載の細胞。
3. 無血清培地に馴化した、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子の開始コドンを含むエクソン領域の部分が欠失した、請求項1または2に記載の細胞。
4. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が $\alpha$ 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞。
5.  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)または(b)から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項4に記載の細胞。
  - (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；
  - (b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。
6.  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項4に記載の細胞。
  - (a) 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
  - (b) 配列番号5で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
  - (c) 配列番号5で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。
7. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求項1～6のいずれか1項に記載の細胞。
8. 耐性が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンを含む培地で培養した場合に、ゲノム遺伝子がノックアウトされる以前の細胞よりも高い生存率を示すことを特徴とする耐性である、請求項7に記載の細胞。
9. 無血清培地が無蛋白培地である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細胞。
10. 糖蛋白質をコードする遺伝子を含む請求項1～9のいずれか1項に記載の細胞。
11. 糖蛋白質が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を有さない糖蛋白質である請求項10に記載の細胞。



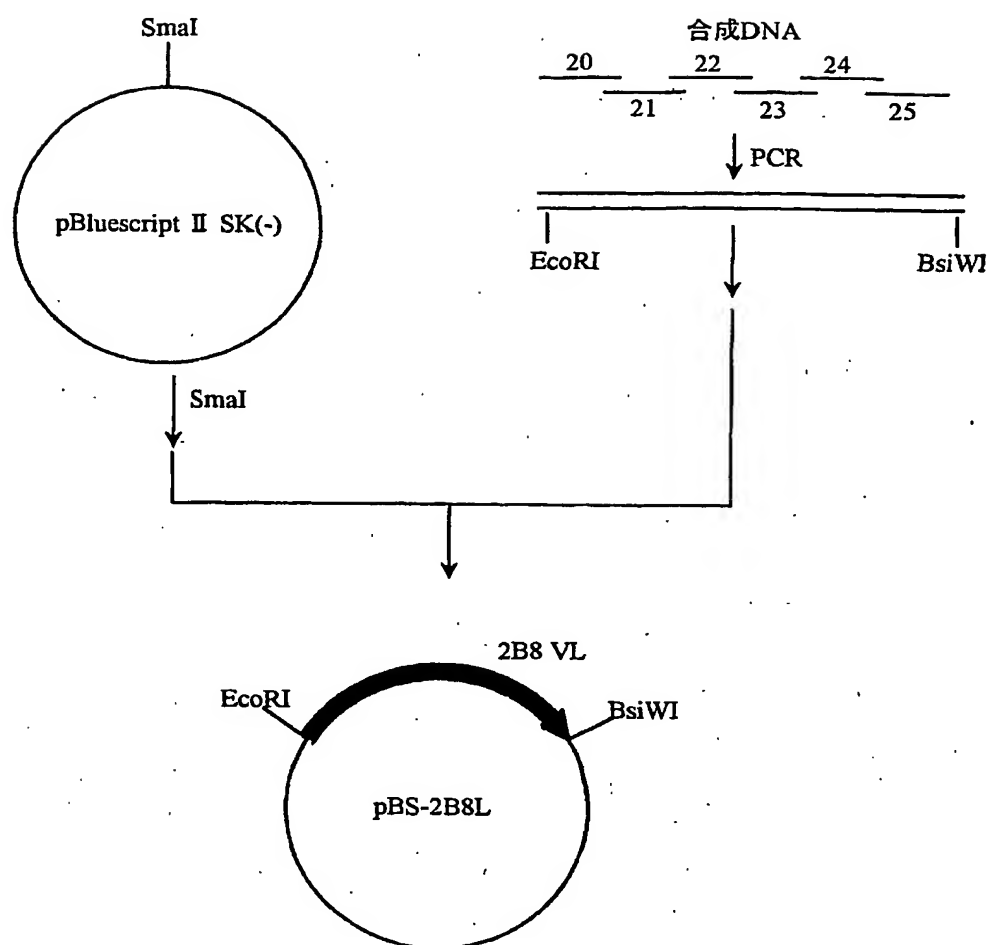
12. 糖蛋白質が、抗体である請求項 10 または 11 に記載の細胞。
13. 抗体のクラスが IgG である、請求項 12 に記載の細胞。
14. 請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、糖蛋白質組成物を製造する方法。
- 5 15. 請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に糖蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から糖蛋白質組成物を採取し、精製する工程を含む、糖蛋白質組成物を製造する方法。
16. 糖蛋白質組成物を製造する方法が、バッチ培養、フェドバッチ培養またはパーフュージョン培養である、請求項 14 または 15 に記載の方法。
- 10 17. 培養中に、栄養因子および生理活性物質から選ばれる少なくとも一種を培地に添加する、請求項 14 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。
18. 栄養因子がグルコース、アミノ酸およびビタミンから選ばれる少なくとも一種である、請求項 17 に記載の方法。
19. 生理活性物質が、インスリン、インスリン様増殖因子、トランスフェリンおよびアルブミンから選ばれる少なくとも一種である、請求項 17 に記載の方法。
- 15 20. 糖蛋白質組成物が、抗体組成物である請求項 14 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。
21. 細胞密度を  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞/ml となるように馴化培地へ接種することを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞の無血清培地への馴化方法。
- 20 22. 請求項 21 に記載の方法で細胞を無血清培地に馴化させた後、クローン化することを特徴とする、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞株を取得する方法。
- 25 23. 請求項 21 に記載の方法で得られる、無血清培地に馴化した N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされた細胞。
24. 請求項 22 に記載の方法で得られる、無血清培地に馴化した N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム遺伝子がノックアウトされたクローン細胞株。
- 30 25. 無血清培地が無蛋白培地である、請求項 21 または 22 に記載の方法。
26. 無血清培地が無蛋白培地である、請求項 23 に記載の細胞。
27. 無血清培地が無蛋白培地である、請求項 24 に記載のクローン細胞株。

図 1



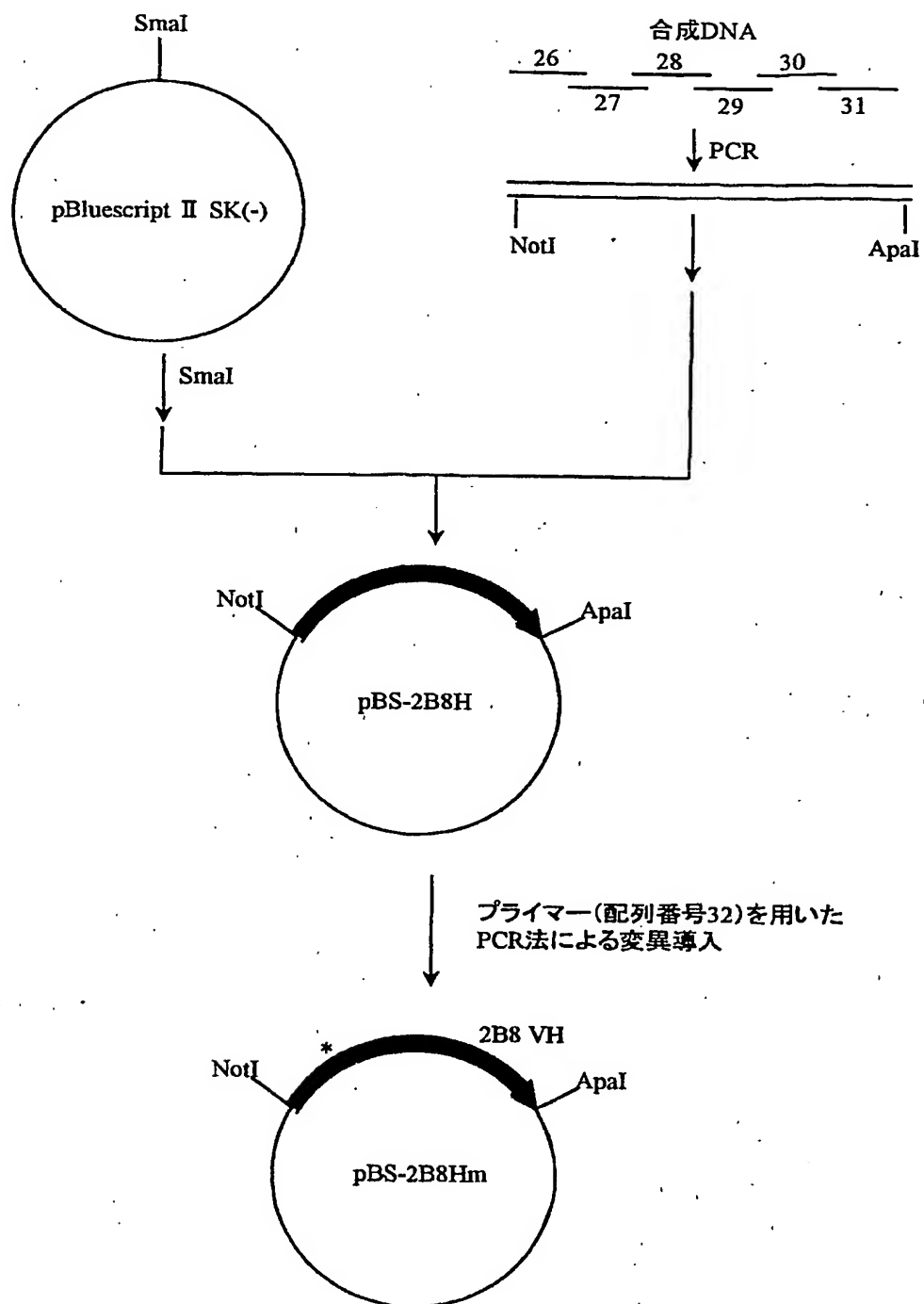
2/12

図 2



3/12

図 3



4/12

図 4

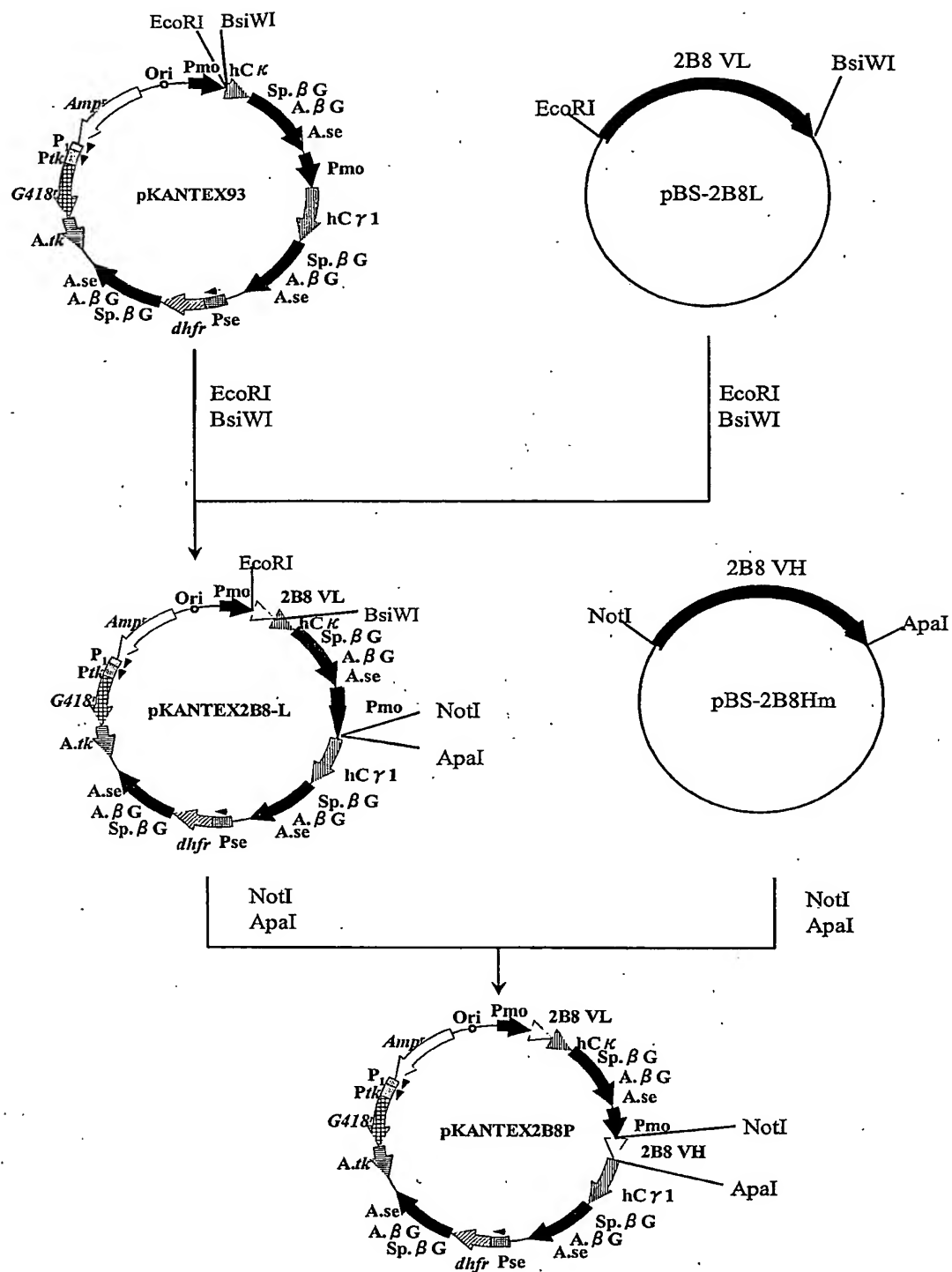
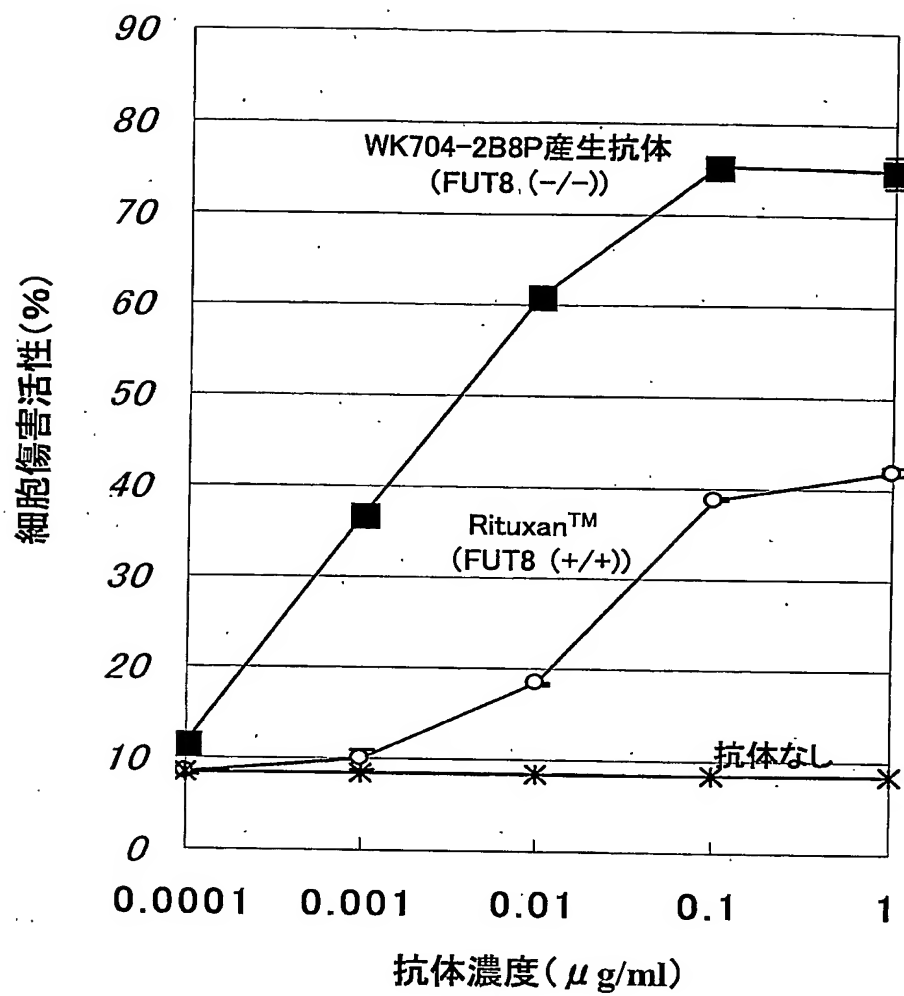
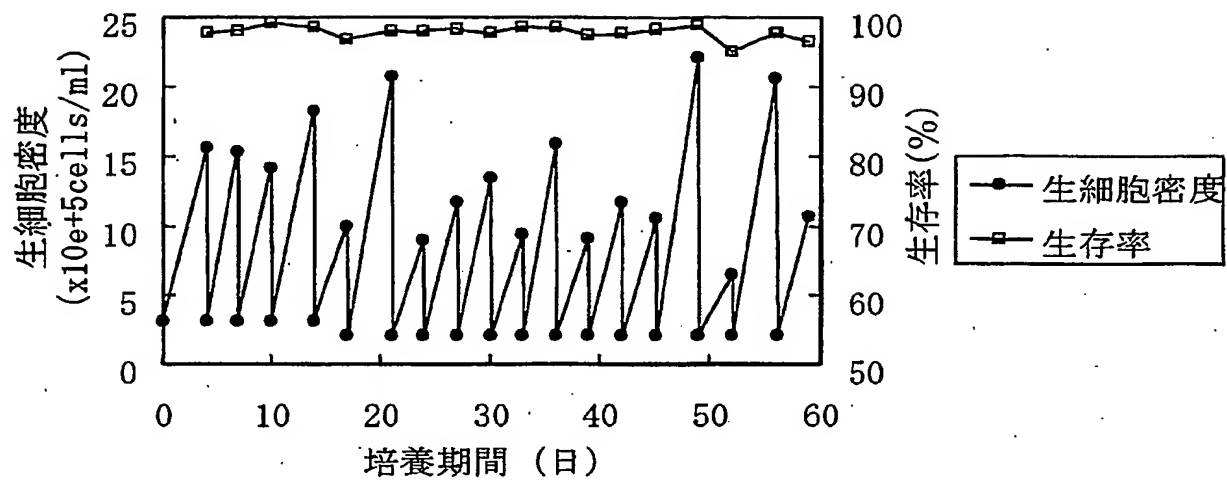


図 5



6/12

図 6





7/12

図 7

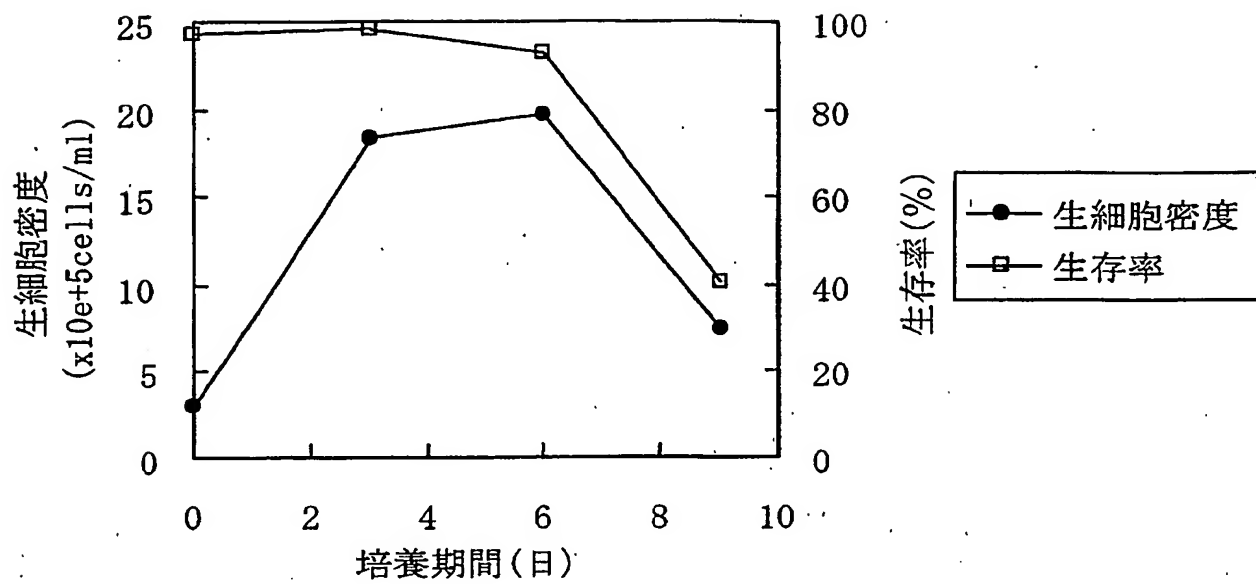
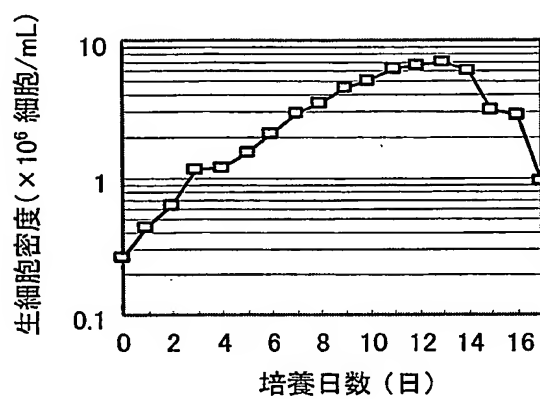
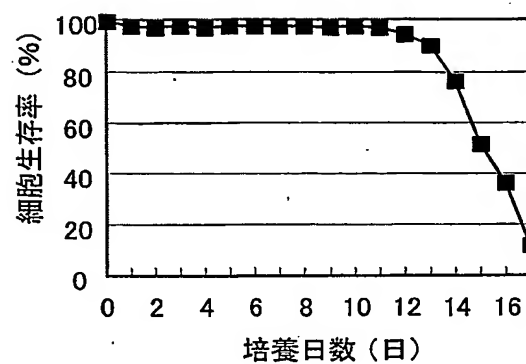


図 8

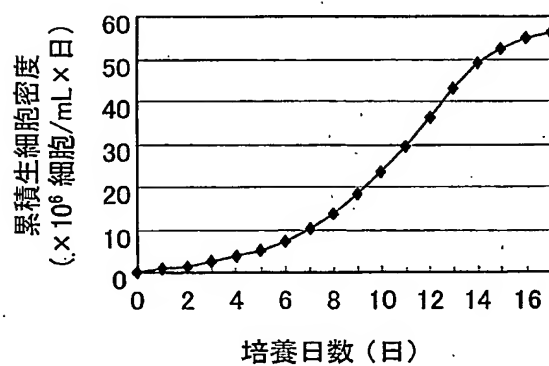
(A)



(B)



(C)



(D)

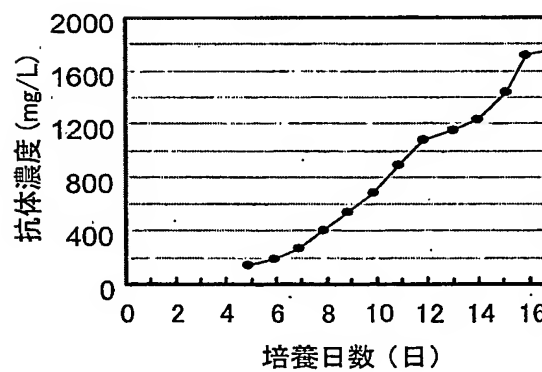
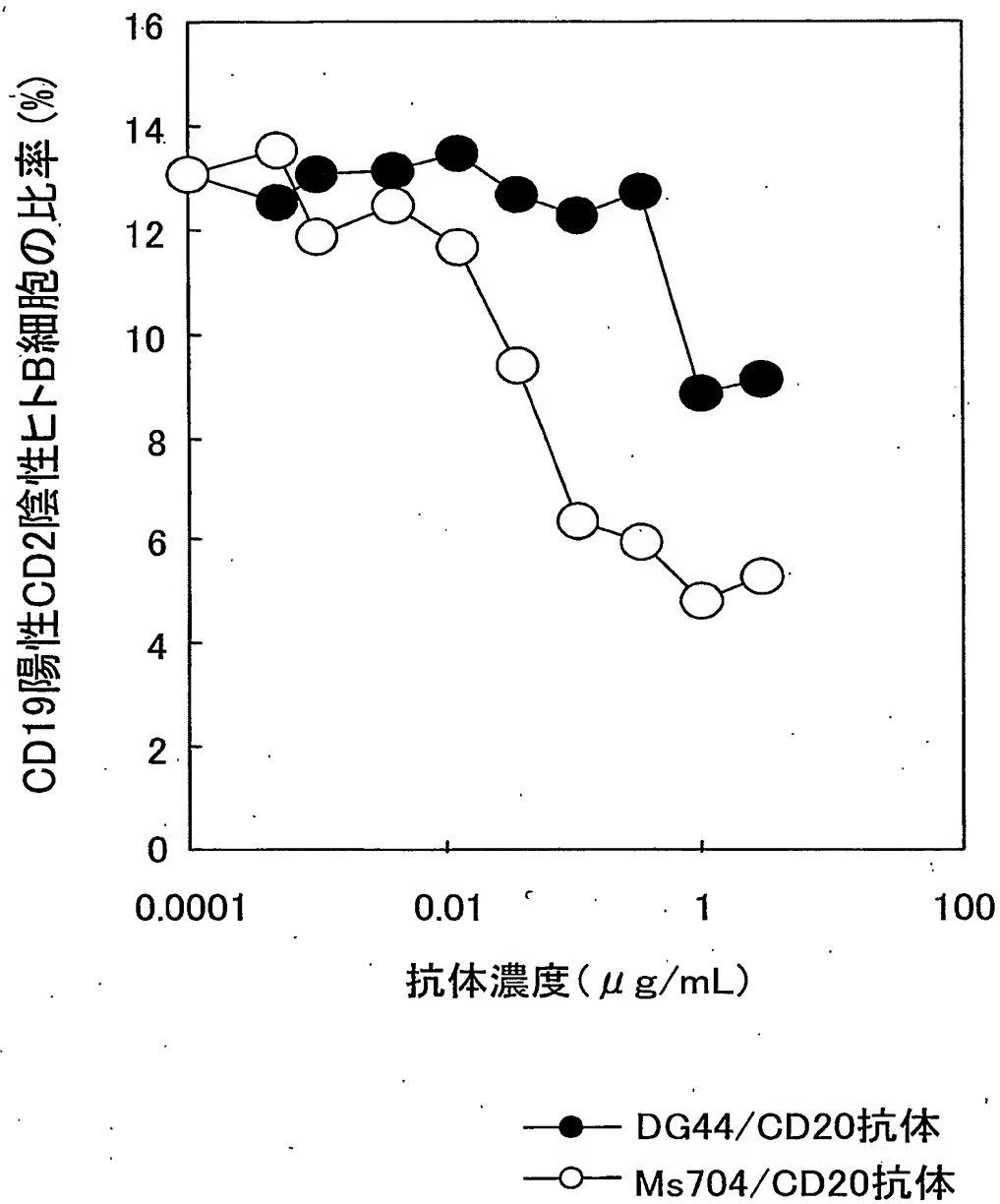
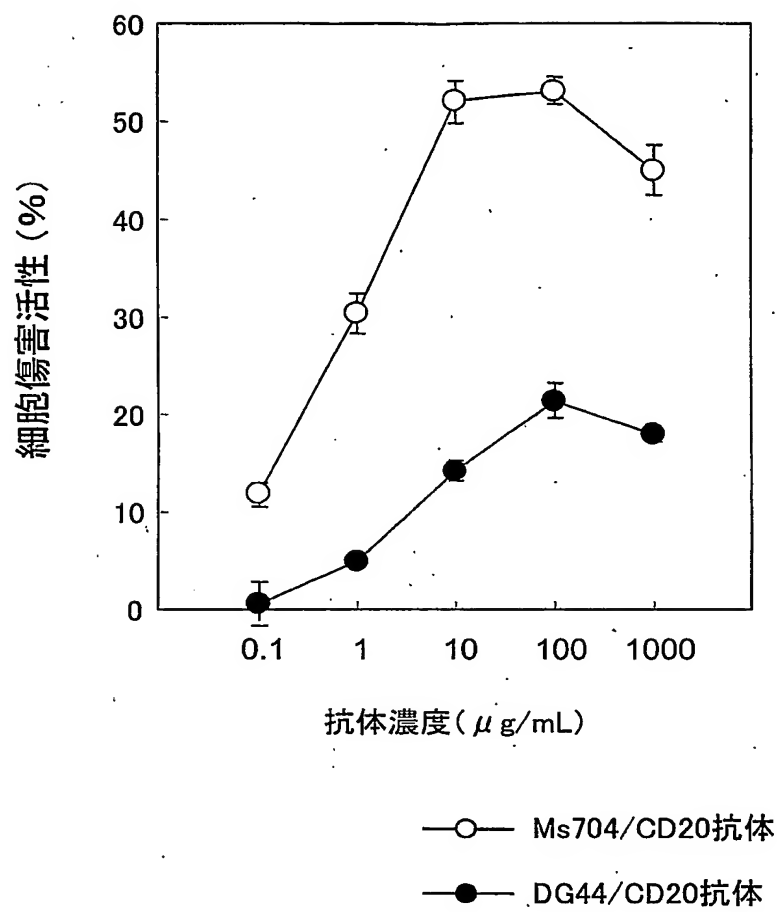


図 9



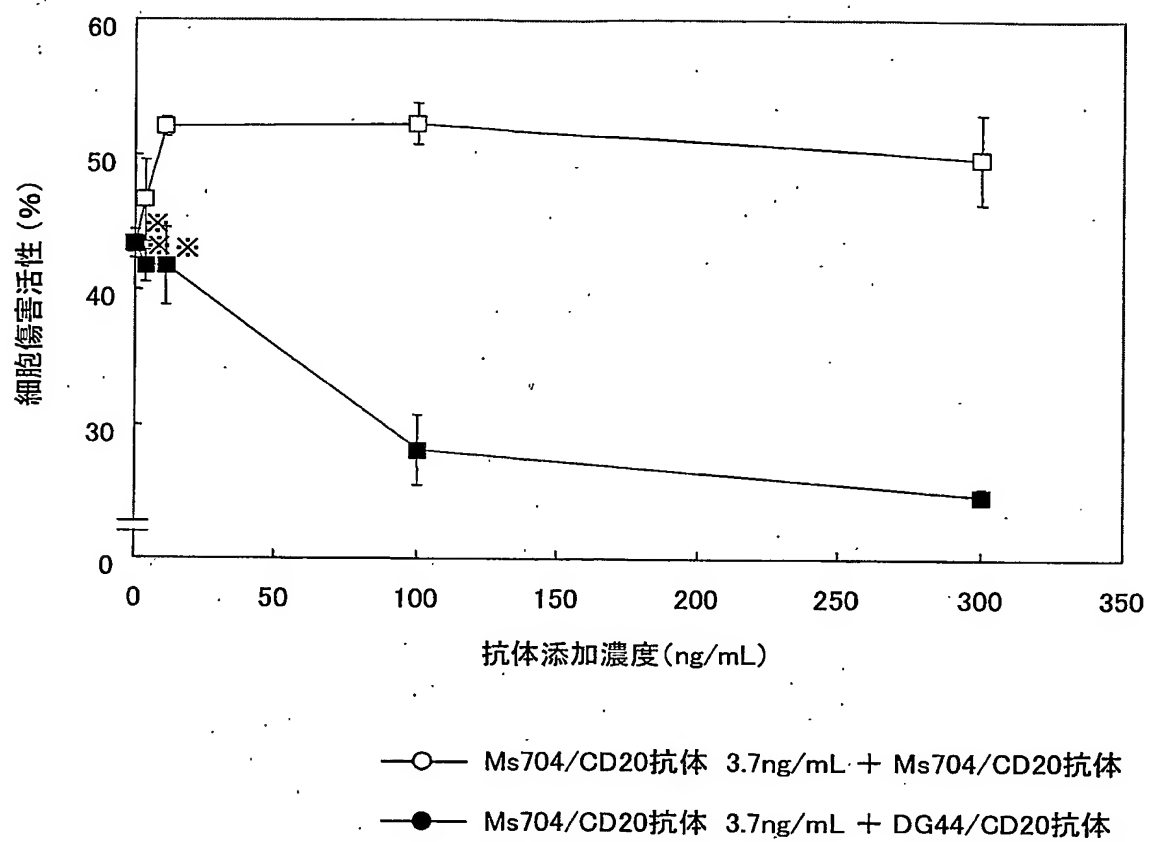
10/12

図 10



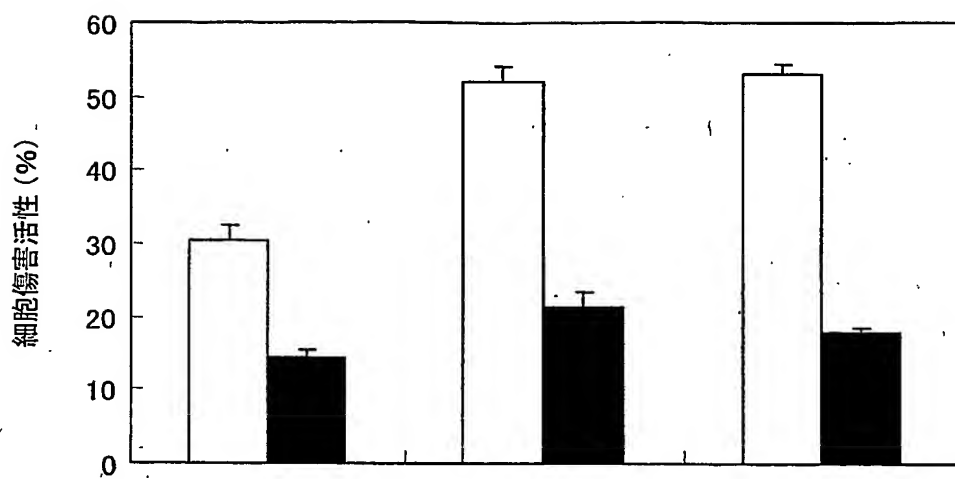
11/12

図 11



12/12

図 1 2



Ms704/CD20抗体 (ng/mL)	1	1	10	10	100	100
	+	+	+	+	+	+
DG44/CD20抗体 (ng/mL)	0	9	0	90	0	900
総抗体濃度 (ng/mL)	1	10	10	100	100	1000

IP20 Rec'd PCT/PTO 10 APR 2005

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

&lt;120&gt; Protein-free medium adapted FUT8 knock out cells

&lt;130&gt; 11620W01

&lt;150&gt; JP2003-350166

&lt;151&gt; 2003-10-09

&lt;160&gt; 32

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2008

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 1

aacagaaact tatattcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactgggttc 120

tggcgttggga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgttitta tataggtgggt 180

catttgggtc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420



ctgggaaagg atcatgaaat cttaggagg aggatigaaa atggagctaa agagctctgg 480  
tttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540  
catgcagatg aaattcittt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600  
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660  
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720  
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780  
gtttactgct tcatgattgc ttaiggcacc cagcgaacac tcatcttga atctcagaat 840  
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagta gacatgcaca 900  
gacaggctcg gccctccac tggacactgg tcaggigaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960  
gtggctcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccctactt acccttggct 1020  
gtaccagaag acctgcaga tgcacccctg agagtcctatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080  
gtatcccagt ttgtcaaata ctgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140  
gaaaccacca agaagcttgg ctcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200  
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260  
gaacatitlc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320  
actgatgacc ctcttttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380  
agtataact ctatttcttg gtcagcttga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440  
cggggcgtga tccctggatat acacttctc tcccaggctg acttccctgt gtgtactttt 1500

tcacccagg tctgtagggt tgcctatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560  
gcaaacticc attctttaga tgacatctac tatittggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620  
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680  
atcatgggtg tggctggaaa ccattggaat gggtactcta aagggtgcaa cagaaaacta 1740  
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800  
cctacataac ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaca acagaattta 1860  
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920  
gtccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgtgca ctggtggaac gccctttgt 1980  
gaagggtgc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactgggtc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60  
ttgttatttt atatagggtg tcatitgggt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120  
agagaactct ccaagattct tgcaaagcct gaacgcctaa aacagcaaaa tgaagacttg 180  
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240  
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gtttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300  
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360

aatggagcta aagagctctg gtttttcta caaagcgaac tgaagaaati aaagcattta 420  
gaaggaaatg aacitcaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480  
aggcttatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540  
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg giccagcgga gaataacata tctccagaat 600  
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660  
ggtigtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg ctatggcac ccagcgaaca 720  
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggt gatgggagac tgtgtttaga 780  
ccgtgaagtg agacatgtac agacagatct ggcccttcca ctggacactg gtcaggtgaa 840  
gtaaatgaca aaaacattca agtggctcag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900  
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960  
ggtgaccctg cagtgtgggt ggtgtccag ttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020  
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080  
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagt ggaacagaag cagccttcca cccatcgag 1140  
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200  
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260  
tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320  
cggtacacag aaaattcact tcgggggtgt atcctggata tacatttct ctcacaggct 1380  
gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtcgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440

accctgcata ctgatgcctc tgcgaacttc cattcttttg atgacatcta ctattttigga 1500  
ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatccacaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560  
attccaatgg aacctggaga tatcatiggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620  
aaaggtaica acagaaaact tggaaaaaca ggcttataic cctcciacaa agtccgagag 1680  
aagatagaaa cagicaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3

<211> 3677

<212> DNA

<213> Homo sapiens (GenBank Accession # : NM\_178156)

<400> 3

cgtttagtac agaaatctca tgggagagag catccatgca ttacaaaatt gttattgaat 60  
tattttattg aatgatgaca cccaaactga gctagaacat aattctggct ctgctagtag 120  
atcttctgtg tgatcttggg caagtcactc tactttcctt tcaattttct tttctcacag 180  
ggagataatc ataaaaacga ctgtaaagta cagcactica tagagtgcct ttgttttaaa 240  
gagctgacaa taaatacgag tctcaaggct taggaaagcc tccctcaca cctgagctgc 300  
ttgaggacaa gggattttct ttgaatcag cagtaacctt ttgtgtatc tgtgatagag 360  
ttcctggtag ataagaaggt ctcaataaat atgigaattt atgaatatta ggcagattgc 420  
aaccttgaca ggccactgcc tcttaaatct cctttctgtg atcttttaat atttaacatc 480  
taaaaggccg ccgctacttg ctttgggata agtatccccg gtaagtactt taaaatgccc 540

aagcctagag aaatgattct tgtcttaagg gcaccatttc gctctccac cgtaaagcgc 600  
cccaggcttg ggaatcgggt cccaaggcta cagggaagag ttiggaacgg gaagctcacc 660  
ttccggccct ctgattggcc ggctcgact ccactcacgc ggcgcgacgc tctgattggc 720  
ctcggcgga cccctcgtcc cgcgactact ttgtgtgtg gggcgcgcg ctcgggtcct 780  
cccgtcagc tggcggtcgt ggctgctctg gggcagccct tcggtcact gctctgcacc 840  
gcggcgccg ggaattttcc gagiccgagc ggcatgtaga gcgcatgaag tacaggacaa 900  
taaagcttc tacacatac accaggagga tctctttgaa agattcactg caggactacc 960  
agagagaata atttgtctga agcatcatgt gtigaaacaa cagaagtcta ttcacctgtg 1020  
cactaactag aaacagagtt acaatgttt caattctttg agctccagga ctccaggga 1080  
gtgagttaga aatctgaaaa tgcggccatg gactgggttc tggcgttga ttatgctcat 1140  
tctttttgcc tgggggacct tgcgtttta tatagggtgt cacttggtac gagataatga 1200  
ccatccgat cactciagcc gagaactgtc caagattctg gcaaagcttg aacgcttaaa 1260  
acaacagaat gaagactga ggcgaaatggc cgaatctctc cggataccag aaggccctat 1320  
tgatcagggg ccagctatag gaagagtacg cgtttttaga gagcagcttg ttaaggccaa 1380  
agaacagatt gaaaattaca agaaacagac cagaaatggt ctggggaagg atcatgaaat 1440  
cctgaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctcigg ttttcctac agagtgaatt 1500  
gaagaaatta aagaacttag aaggaaatga actccaaaga catgcagatg aatttctttt 1560  
ggatttagga catcatgaaa ggtctataat gacggatcta tactacctca gtcagacaga 1620

tggagcaggt gatggcgagg aaaaagaggc caaagatcig acagaactgg ttcagcggag 1680  
aataacatat cttcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc aaaaagctgg tgtgtaatat 1740  
caacaaaggc tgggctatg gctgtcagct ccatcatgig gcttactgct tcatgattgc 1800  
atatggcacc cagcgaacac tcatcttggc atctcagaat tggcgctatg ctactgggtg 1860  
atgggagact gtatttaggc ctgtaagiga gacatgcaca gacagatcig gcatctccac 1920  
tggacactgg tcaggigaag tgaaggacaa aaatgttcaa gtggtcgagc tccccattgt 1980  
agacagtcct catcccgct ctcataatit acccttggct giaccagaag acctcgaga 2040  
tcgacttgta cgagtgcatt gtgacctgc agtgtggigg gtgtctcagt ttgtcaaata 2100  
cttgatccgc ccacagcctt ggctagaaaa agaaatagaa gaagccacca agaagcttgg 2160  
cttcaaacat ccagttattg gattccatgt cagacgcaca gacaaagtgg gaacagaagc 2220  
tgccctccat cccattgaag agtacctggt gcatgttgaa gaacatitc agcttcttgc 2280  
acgcagaatg caagtggaca aaaaaagagt gtatttggcc acagatgacc ctcttttatt 2340  
aaaggaggca aaaacaaagt accccaatta tgaatttatt agtgataact ctatttctg 2400  
gtcagctgga ctgcacaatc gatacacaga aaattcactt cgtggagtga tcctggatat 2460  
acattttctc tctcaggcag acttcctagt gtgtactttt tcatcccagg tctgtcgagt 2520  
tgcttatgaa attatgcaaa cactacatcc tgatgcctct gcaaacttcc attctttaga 2580  
tgacatctac tattttgggg gccagaatgc ccacaatcaa attgccattt atgctcacca 2640  
accccgaaat gcagatgaaa ttcccatgga acctggagat atcattggtg tggctggaaa 2700

tcattgggat ggctatticta aagggtgtcaa caggaaattg ggaaggacgg gcctatatcc 2760  
ctcctacaaa gticgagaga agatagaaac ggicaagtac cccacataic ctgaggctga 2820  
gaaataaagc tcagatggaa gagataaacg accaaactica gticgaccaa actcagtica 2880  
aaccatttca gccaaactgt agatgaagag ggctctgata taacaaaata aggttatatg 2940  
agtagatact ctgagcacca agagcagctg ggaactgaca taggtticaa ttggttggaat 3000  
tctcttttaa caagggctgc aatgccctca tacccatgca cagtacaata atgtactcac 3060  
atataacatg caaacagggt gtttcttact ttgccccitt cagtatgtcc ccataagaca 3120  
aacactgcca tattgtgtaa tttaagtgac acagacattt tgtgtgagac ttaaaacatg 3180  
gtgcctatat ctgagagacc tigtgtgaact attgagaaga tcggaacagc tccctactct 3240  
gaggaagttg attcttattt gatgggtggtt ttgtgaccac tgaattcact ccagtcaaca 3300  
gattcagaat gagaatggac gtttggtttt tttttgtttt tgtttttgtt ttttccittt 3360  
taaggttgtc tgtttttttt tttttaaata attgcatcag ttcattgacc tcatcattaa 3420  
taagtgaaga atacatcaga aaataaaaata ttacatctcc attagaaaat ttgttaaaac 3480  
aatgccatga acaaattctt tagtactcaa tgtttctgga cattctcttt gataacaaaa 3540  
aataaatttt aaaaaggaat ttgttaaagt ttctagaatt ttatatcatt ggatgatatg 3600  
ttgatcagcc ttatgtggaa gaactgtgat aaaaagagga gctttttagt ttttcagctt 3660  
aaaaaaaaa aaaaaaa 3677

<211> 1836

<212> DNA

<213> Sus scrofa (GenBank Accession # : D86723.1)

<400> 4

atgttttcaa ttctttgagc tctaggaagc cacgaaagtg agttgaaagt ctgaaaatgc 60  
ggccatggac tggttcgtgg cgttggatta tgctcattct ttttgcttgg gggaccttgc 120  
tattttacat aggiggicac ttggtacgag ataataacca ctctgatcac tctagccgag 180  
aactgtccaa gattttggca aagctggaac gcttaaaaca acaaaatgaa gacttgagga 240  
gaatggctga atctctccga ataccagaag gcccattga tcagggggcca gcttcaggaa 300  
gagttcgtgc tttagaagag caatttatga aggccaaaga acagattgaa aattataaga 360  
aacaactaa aaatgggtcca gggaaggatc atgaaatcct aaggaggagg attgaaaatg 420  
gagctaaaga gccttggttt ttcttacaaa gtgagttgaa gaaattaaag aatttagaag 480  
gaaatgaact ccaaagacat gcagatgaat ttctatcaga ttggggacat catgaaaggt 540  
ctataatgac ggaictatc tacctcagtc aaacagatgg ggcaggatgat tggcgtgaaa 600  
aggaggccaa agatctgaca gagctgggtcc agcggagaat aacatatctt cagaatccca 660  
aggactgcag caaagccaag aagctagtgt gtaatatcaa caaaggctgt ggctatggct 720  
gtcagctcca tcatgtagtg tactgcttta tgattgcata tggcaccag cgaacactcg 780  
cccttggaatc tcacaattgg cgctacgcta ctgggggatg ggaaactgtg tttagacctg 840  
taagtgagac gtgcacagac agatctggca gctccactgg acatttgtca ggtgaagtaa 900  
aggacaaaaa tgttcagggtg gttgagctcc ccatgttga cagtgttcat cctcgtcctc 960



catatttacc cctggctgtc ccagaagacc ttgcagatcg acttgtacga gtccaiggtg 1020  
atcctgcagt gtggigggtg tccagtttg tcaagtactt gattcgccca caaccctggc 1080  
tggaagagga aatagaagag gccaccaaga agctaggcctt caaacatcca gttattggag 1140  
tccatgtag acgcacagac aaagtgggag cggaagcagc ctccaatccc attgaggaat 1200  
acacgggtgca cgttgaagaa gactttcagc ttcttgctcg cagaatgcaa gtggataaaa 1260  
aaagggtgta ttggccaca gatgacctg ctttgttaaa agaggcaaaa acaaagtacc 1320  
ccagttatga atttattagt gataactcta tctcttggtc agctggacta cataatcgat 1380  
atcacagaaa ttacattcgg gggtgaltcc tggatataca ctctctctcc caggcagact 1440  
tcttagtgtg tactttttca tcgcaggctt gtagagtgc ttaatgaaac aigcaagcgc 1500  
tgcattctga tgcctctgcg aacttccgtt ctttggatga catctactat ttggagggcc 1560  
caaatgccca caaccaaatt gccatttatc ctaccaacc tcgaactgaa ggagaaatcc 1620  
ccaiggaacc tggagataat attggtgtgg ctggaaatca ctgggatggc taccctaaag 1680  
gtgttaacag aaaactggga aggacgggcc tataatccctc ctacaaagt cagagagaaga 1740  
tagaaacagt caagtacccc acatatcccg aggcigacaa gtaaagcttg gacggacaga 1800  
tgagaaagac aaccaaactc agttcaaacc atttga 1836

<210> 5

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

&lt;400&gt; 5

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20

25

30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35

40

45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50

55

60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65

70

75

80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln

85

90

95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His

100

105

110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe

115

120

125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu

130

135

140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

145

150

155

160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala

165

170

175

Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln

180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		
225	230	235
240		
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu		
245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val		
275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu		
290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His		
305	310	315
320		
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile		
325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys		
340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp		
355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val		

370 375 380  
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp  
385 390 395 400  
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu  
405 410 415  
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
420 425 430  
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
435 440 445  
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
450 455 460  
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
465 470 475 480  
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
485 490 495  
Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
500 505 510  
His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
515 520 525  
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn  
530 535 540  
Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
545 550 555 560  
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys

565

570

575

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr  
65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln  
85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His  
100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe  
115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu  
130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu  
145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala  
165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln  
180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg  
195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu  
210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr  
225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu  
245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu  
260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val  
275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu  
290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His  
305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile  
325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys  
340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp  
355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val  
370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp  
385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu  
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn  
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
565 570 575

<210> 7

<211> 446

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ala Ile Thr Val Ser Leu Val Asn Asn Lys Arg Lys Ile Val Val  
1 5 10 15

Leu Ala Gln Pro Thr Thr Val Lys Arg Lys Arg Ile Thr Pro Tyr Lys  
20 25 30

Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala Gly  
35 40 45

Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln Arg  
50 55 60

Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys Lys  
65 70 75 80

Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu His  
85 90 95

His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr Leu  
100 105 110



Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu Thr  
115 120 125

Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile Ser  
130 135 140

Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val Val  
145 150 155 160

Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro  
165 170 175

Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His Gly  
180 185 190

Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile Arg  
195 200 205

Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys Leu  
210 215 220

Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp Lys  
225 230 235 240

Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val His  
245 250 255

Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp Lys  
260 265 270

Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile Ser  
290 295 300

Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg Gly  
305 310 315 320

Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val Cys  
325 330 335

Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln Thr  
340 345 350

Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile Tyr  
355 360 365

Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala His  
370 375 380

Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile Ile  
385 390 395 400

Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn Arg  
405 410 415

Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu Lys  
420 425 430

Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
435 440 445

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 8

Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1	5	10	15
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp			
20	25	30	
Asn Asp His Ser Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala			
35	40	45	
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala			
50	55	60	
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ser			
165	70	75	80
Gly Arg Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln Phe Met Lys Ala Lys Glu Gln			
85	90	95	
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Lys Asn Gly Pro Gly Lys Asp His			
100	105	110	
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe			
115	120	125	
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu			
130	135	140	
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Ser Asp Leu Gly His His Glu			
145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
165	170	175	
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
180	185	190	
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys			

195 200 205  
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu  
210 215 220  
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr  
225 230 235 240  
Leu Ala Leu Glu Ser His Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu  
245 250 255  
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ser  
260 265 270  
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val  
275 280 285  
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Val His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu  
290 295 300  
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His  
305 310 315 320  
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile  
325 330 335  
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys  
340 345 350  
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp  
355 360 365  
Lys Val Gly Ala Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Thr Val  
370 375 380  
His Val Glu Glu Asp Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp

385                      390                      395                      400  
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ala Leu Leu Lys Glu  
                         405                      410                      415  
Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Ser Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
                         420                      425                      430  
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
                         435                      440                      445  
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
                         450                      455                      460  
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
465                      470                      475                      480  
Ala Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe Arg Ser Leu Asp Asp Ile  
                         485                      490                      495  
Tyr Tyr Phe Gly Gly Pro Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Pro  
                         500                      505                      510  
His Gln Pro Arg Thr Glu Gly Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
                         515                      520                      525  
Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Pro Lys Gly Val Asn  
                         530                      535                      540  
Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
545                      550                      555                      560  
Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Asp Lys  
                         565                      570                      575

<210> 9

<211> 9196

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 9

tctagaccag gctggctctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60  
ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120  
atttacatta taattgtaag taaaaatctt cagcctatct tgttatacat ttttgcgtaa 180  
attattcttt ttigaaagt ttgtgtctca taatagtcta gggaaacata aagtataat 240  
ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300  
ggtatgtaat agcttcaaca tgggtatga tagaattttt cagtgtata taagtgtta 360  
cagcaaagtg ttattaatc atatgtccat atttcaattt ttatgaatt attaaattga 420  
atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480  
ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt ctccacctgt tttagaacat 540  
ggtccaagaa tggagtatg taagggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600  
gatgagtcct gtgacctag ttcttttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatt 660  
ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat tttagattat ttattacaac tggctgttgt 720  
tactgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tattttttt gccacatga gctgttcctt 780  
atgatattat actgtgtga ctcttaactc tcagagtata aatgtctga tgctatgaat 840  
aaagtggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcac tctctcagat 900

cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagacttttag tctttatttg 960  
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020  
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080  
agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140  
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggg 1200  
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttttg catttaaagt 1260  
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaactctga tttttggaat cccctttctt 1320  
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttaattttgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380  
tagccttgta tatgtaaaag ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440  
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagtgc ccagtcactt taagttacat 1500  
tticatatat gtcttttttg ggaggagata attttatctc taagagaatc ctaagcatac 1560  
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620  
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgta gccctctttt ggaattttta 1680  
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740  
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800  
ggttgatcc atttgaacct ttgatgttt ggttggttg ccaattggtt gatggttatg 1860  
ataaccttg ctctcttaag gtccaagta gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920  
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980

ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040  
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100  
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ticcagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160  
aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220  
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280  
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340  
gcacaggaca agaaagctgc ctcttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400  
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460  
attttctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520  
aagacagaag ggagttagaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580  
tatgtcatt cttttgcct gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640  
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700  
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760  
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg ctgaccttt aggtataggg tctcagtcgt 2820  
ctgttgaaaa atataatttc taaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880  
tttttaaag tcagtatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940  
ttttgcatai gaatcagtat atagaagcag tggcatitat atgcttatgt tgcaattaca 3000  
attaigttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgcattt aaatttttt 3060



atcttatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120  
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgc tccggaatgt gggtaattat 3180  
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagtgttttg 3240  
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300  
ttaacttgca gttactgagt ttacaagtig tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360  
tctaagaatg atcatgtgta cagtgccttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420  
tgcagataig aagacttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480  
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540  
tagagaggat gcctctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600  
cttttagaac tcagatgttt catatgggat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660  
aaatgtctat ggaatgataat gtgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720  
tcttcggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780  
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840  
cagggaggtt taigaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900  
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa ttgtcatat gtgccattt 3960  
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa ttcttagata tctttatgag attctagtag 4020  
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080  
aagattatac gtaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140

tccgaactct tatcttccia agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200  
taaaagtcic aggagagact tcccatccfg agaagatcic ttttcccttt tataatttag 4260  
gtccttgaat aatcactgaa ttttctccat gtccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320  
tccittttic ttaccacaaa gtatcttggt ttgtctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380  
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440  
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagtgggcta gggcttctta ttggctagct 4500  
ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgaagtatt tccatgtgtt cttatcttac 4560  
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gaggagagag 4620  
cgatttccia ttgtctctg cttattttct gattctgtc agctatgtca ctccctgect 4680  
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740  
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800  
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860  
ttgtgtcat aagtagcatg gattgcagaa gagggaaatca gatctttttt taagggacaa 4920  
agagtttatt cagattacat tttaaggta taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980  
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagica agagtagaga gcaatgaatt 5040  
gatgatgca ttctgtgtc cagctcactt ttctgggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100  
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagtcaaaa acctgttctt aagtataagc 5160  
catctctcca gtccctcata tggctcttta agacacttct ttatattct tgtacataga 5220

aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280  
aatgtaaata caatctagaa catTTTTata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340  
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggcigtctc tagattctac 5400  
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460  
tggacatgct tgttagcatt tagactttt tcttactat aattgagcta gtattttgt 5520  
gcicagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggttaatttc tttgtgataa 5580  
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcttgaaatg acagttttta agattcagaa 5640  
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt tcttgatat 5700  
gigataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgattttt 5760  
tttcaaattt aggctagttc actagtgtg tgttaaggta tggctgcaa catcttgac 5820  
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttgtt ccattctggg 5880  
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940  
aggatataat tictatattc tgtattttt tctctgtca tatatttgct tctgtttta 6000  
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact tctttacact tcttttgga tttatttgc 6060  
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120  
atagactgaa tgccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180  
ttttttaata ttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240  
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300

tictatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360  
atTTTTtTgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttattttaatt 6420  
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480  
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540  
tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggctt actgatattg gtctaatct tatatagcat 6600  
gttgtttgtt aggtagtga ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660  
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg ctgtgtgtct cctatcggtt 6720  
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt ttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780  
cttgttttct gigaattaac cctttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttaagggac 6840  
aacaagtta ttacagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900  
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacattt catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960  
tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020  
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcataac cacttacttc agtcatgca 7080  
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140  
ccagatgatt agactgtgtc aagttagcaa ttaaaactat cacaccigaa gccatcacta 7200  
gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttatgtta 7260  
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttcttccctt aaaaacctgt ttttagtta 7320  
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagtiagata ttattttcaa 7380

gtatgttctc ccagtccttg gcttgiatit tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440  
ttatitititit tatitaaait agaaacaaag ctgcctttac atgtcagtc cagttccctc 7500  
tccctccctt cctccctgc tccccacctt agccccaait ccaactcctt tcttctcccc 7560  
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat ctccaatgtc tgcataatca tttggagcag 7620  
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat cctctatgt ggagagggt 7680  
cccaaagttc atttgiatc taggggtaaa tactatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740  
tgtccggacc tccaaactga ctccctcctt caggagtc cgaacagttc tatgttggt 7800  
tccagatat cagtcgggg tccatgagca accccttgtt caggtcagtt gtttctgtag 7860  
gtttccccag cccggcttg accccttgc tcatcactt cctctcttg caactggatt 7920  
ccagagttca gctcagtggt tagctgtggg tgtctgcatc tgcttccatc agctactgga 7980  
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtc attatcagag aagggtttt 8040  
aaggtagcct ctgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100  
acagtgacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160  
tgctctcatc cgttctctcc ctgactagat ctccctgctc cctcatgtcc tctctctccc 8220  
tccctttctc ccttctctt tcttctaact cctctctccc tccaccacg atccccatta 8280  
gcttatgaga tcttgcctt attttagcaa aaccttttg gctataaaat taattaattt 8340  
aataigctta tctcaggttt attttgcta gtattgtat gtgtttggtt agtgtttta 8400  
accttaattg acatgtatcc ttatatattg acacagaatt aaatatitga agttttttt 8460

tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gccatgcatgc cagaagaggg 8520  
caccagatct cattcaaggt ggttgtagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580  
gacctctgga agaacagtca gtcctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640  
gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700  
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca gggttacatt ttcttttacc 8760  
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcacc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820  
ttttattttt ctgtttttac agtaagtta atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880  
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940  
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000  
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060  
caggatgagc caacttttaa tgggttaccag tggataagag tgcctgtatc tctagcacc 9120  
atgaaaattt atgcattgct atatgggcct gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180  
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 14

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 15

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16



gtgagtcctat ggctgtcact g

21

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 17

cctgacttgg ctattctcag

20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 18

atg gat ttt cag gtg cag att atc agc ttc ctg cta atc agt gct tca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
1 5 10 15	
gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc tcc cag tct cca gca atc	96
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile	
20 25 30	
ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc agg gcc agc	144
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser	
35 40 45	
tca agt gta agt tac atc cac tgg ttc cag cag aag cca gga tcc tcc	192
Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser	
50 55 60	
ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct	240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	
65 70 75 80	

```

gtt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg act tct tac tct ctc acc atc 288
Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
      85          90          95
agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg 336
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
      100          105          110
act agt aac cca ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa atc aaa 384
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      115          120          125

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 420

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 19

```

atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt 48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
  1          5          10          15
gtc ctg tcc cag gta caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
      20          25          30
cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35          40          45
acc agt tac aat atg cac tgg gta aaa cag aca cct ggt cgg ggc ctg 192
Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
      50          55          60
gaa tgg att gga gct att tat ccc gga aat ggt gat act tcc tac aat 240
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
      65          70          75          80
cag aag ttc aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
      85          90          95
aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336

```

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                   100                  105                  110  
 tat tac tgt gca aga tcg act tac tac ggc ggt gac tgg tac ttc aat 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn  
                   115                  120                  125  
 gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tct gca 420  
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
                   130                  135                  140

<210> 20

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

caggaaacag ctatgacgaa ttgcctcct caaaatggat tticaggtgc agattatcag 60  
 cticctgcta atcagtgcctt cagtcataat g 91

<210> 21

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

gtgaccttct cccctggaga tgcagacagg attgctggag actgggagag aacaatttgt 60  
 cctctggaca ttatgactga agcactgatt a 91

<210> 22

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

ctccagggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt tacatccact 60  
ggttccagca gaagccagga tcctccccc 90

<210> 23

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

ccagaccac tgccactgaa gcgaacaggg actccagaag ccaggttgga tggggcataa 60  
atccagggtt tgggggagga tcctggcctt 89

<210> 24

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

tcagtggcag tgggtctggg acttcttact cctccacat cagcagagtg gaggtgaag 60

atgctgccac ttattactgc cagcagtgga c

91

<210> 25

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

gttttccag tcacgaccgt acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgggt 60

gggttactag tccactgctg gcagtaataa

90

<210> 26

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

caggaaacag ctatgacgcg gccgcgaccc ctaccatgg gttaggagcct catcttgctc 60

ttccttgctg ctgttgctac gcgtgtcctg tcccaggta

99

<210> 27

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

atgtgtagcc agaagccttg caggacatct tcactgaggc cccagccttc accagctcag 60  
ccccaggctg ctgcagttgt acctgggaca ggacacgc 98

<210> 28

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

caaggcttct ggctacacat ttaccagtta caatatgcac tgggtaaaac agacacctgg 60  
tcggggcctg gaatggattg gagctattta tcccga 97

<210> 29

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

gtaggctgtg ctggaggatt tgtctgcagt caatgtggcc ttgcctttga acttctgatt 60  
gtaggaagta tcaccatttc cgggataaat agctccaat 99

<210> 30

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

aatcctccag cacagcctac atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct 60  
attactgtgc aagatcgact tactacggcg gtgactggt 99

<210> 31

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

gttttccag tcacgacggg ccttgggtgg aggcctgcaga gacggtgacc gtggtccctg 60  
cgccccagac attgaagtac cagtcaccgc cgtagtaa 98

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

gagctggatg agcctggggc ctcag

25